



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

**OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE
A LAS CASEINAS DE LA LECHE DE CABRA Y SU
UTILIZACION EN LA DIFERENCIACION DE
MEZCLAS LACTEAS Y QUESOS**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Veterinaria presenta la
Licenciada Ana Isabel Haza Duaso.

Madrid, noviembre de 1995.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

PALOMA MORALES GOMEZ, PROFESORA TITULAR DE
NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "**Obtención de anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra y su utilización en la diferenciación de mezclas lácteas y quesos**", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Ana Isabel Haza Duaso, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta de los catedráticos D. Bernabé Sanz Pérez y D. Pablo E. Hernández Cruza y de la que suscribe, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 13 de noviembre de 1995

Fdo: Paloma Morales

Fdo: Bernabé Sanz

Fdo: Pablo E. Hernández

INDICE

I. EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	PAGINA 1
II. INTRODUCCION	5
II.1. LA LECHE	6
1.1. Generalidades	6
1.2. Diferencias de composición de las leches de vaca, oveja y cabra	6
1. Leche de oveja	8
2. Leche de cabra	9
II.2. COMPOSICION PROTEICA DE LA LECHE	10
2.1. Nomenclatura de las proteínas lácteas	10
2.2. El polimorfismo genético de las lactoproteínas	13
1. Estructura y localización de los genes que codifican las caseínas	14
2. Estructura y localización de los genes que codifican las proteínas séricas	15
2.3. Modificaciones post-traduccionales responsables de la heterogeneidad de las proteínas	15
II.3. CASEINAS	18
3.1. Micela de caseína	18
3.2. Características moleculares de las caseínas	19
3.3. Obtención y fraccionamiento de las caseínas	24
1. Métodos de solubilidad diferencial	24
2. Métodos electroforéticos	25
3. Métodos cromatográficos	25
1. Técnicas cromatográficas clásicas	26
2. Fraccionamiento por técnicas cromatográficas de alta resolución	29
II.4. TIPOS DE CASEINAS	34
4.1. Caseína α_{s1}	34
4.2. Caseína α_{s2}	37
4.3. Caseína β	39

4.4. Caseína κ	41
II.5. DIFERENCIAS EN LA COMPOSICION CASEINICA DE LAS LECHES DE VACA, OVEJA Y CABRA	43
5.1. Caseína α_{S1}	44
5.2. Caseína α_{S2}	48
5.3. Caseína β	48
5.4. Caseína κ	49
II.6. OTRAS PROTEINAS LACTEAS	52
6.1. Proteínas del lactosuero	52
1. β -Lactoglobulina	52
2. α -Lactoalbúmina	53
3. Albúmina sérica bovina	53
4. Immunoglobulinas	53
6.2. Proteínas de la membrana del glóbulo graso	54
6.3. Proteínas minoritarias	54
6.4. Enzimas	54
II.7. QUESOS	55
7.1. Clasificación de los quesos españoles: tipos y familias	55
1. Quesos de España con denominación de origen y genérica	57
7.2. La leche para la fabricación del queso	57
7.3. Comportamiento de las proteínas lácteas durante la fabricación del queso	60
1. Coagulación	61
2. Maduración	62
1. Acción del cuajo	62
2. Proteasas nativas de la leche	63
3. Proteasas de las bacterias lácticas	63
7.4. Degradación de las proteínas del queso	64
II.8. TECNICAS ANALITICAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR EL ORIGEN ESPECIFICO DE LA LECHE Y DERIVADOS LACTEOS	66
8.1. Métodos cromatográficos	66

8.2. Métodos electroforéticos	69
8.3. Métodos inmunológicos	73
1. Técnicas clásicas	77
2. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)	80
1. Inmunodotting	82
2. Immunoblotting	82
3. Técnicas ELISA	82
III.MATERIAL Y METODOS	90
III.1. MATERIAL GENERAL	91
1.1. Material de laboratorio	91
1.2. Material biológico	93
1. Animales de experimentación	93
2. Origen de las muestras	93
1.3. Productos y reactivos	94
III.2. METODOS	95
2.1. Preparación de las muestras	95
1. Obtención de las caseínas	95
2. Mezclas lácteas	97
3. Mezclas de quesos	97
2.2. Determinación de la proteína	98
2.3. Fraccionamiento de la caseína de la leche de cabra	
por cromatografía de intercambio iónico	99
1. Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC)	100
1. Preparación de la caseína	100
2. Fraccionamiento	102
2. Cromatografía de intercambio aniónico con	
DEAE-celulosa	102
1. Preparación de la celulosa y relleno de la	
columna	102
2. Preparación de la caseína	103
3. Fraccionamiento	103
3. Cromatografía de intercambio catiónico en	
una matriz de S-Sepharose Fast-Flow	103
1. Preparación de la matriz y relleno de la	
columna	103

2. Preparación de la caseína	105
3. Fraccionamiento	105
2.4. Caracterización de las fracciones caseínicas purificadas	105
1. Electroforesis en presencia de agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	105
1. Preparación de las muestras	107
2. Electroforesis	107
3. Teñido y desteñido del gel	107
2.5. Caracterización inmunológica parcial de las fracciones caseínicas purificadas	108
2.6. Producción de anticuerpos policlonales	108
1. Protocolo de inmunización	108
1. Comprobación de la inmunización	108
2. Sangría final	109
3. Obtención y conservación del suero	109
2. Purificación parcial de los inmunosueros	109
1. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico	109
2.7. Obtención y producción de anticuerpos monoclonales	110
1. Protocolo de inmunización	111
1. Comprobación de la inmunización	111
2. Medios de cultivo y soluciones empleadas	111
3. Obtención de los hibridomas	113
1. Obtención de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados	113
2. Células de mieloma	
1. Mantenimiento y propagación de las células	115
3. Preparación de las células para la fusión	115
4. Preparación del agente fusionante	115
5. Fusión celular	116
4. Selección y mantenimiento de los hibridomas	116
1. Medio selectivo	117
2. Preselección de los hibridomas productores de anticuerpos de interés	117
5. Clonación de los hibridomas de interés	118
1. Expansión de los clones	118

2. Conservación de los clones	119
6. Producción de Ac _m en gran escala	119
1. Cultivo de los hibridomas	119
2. Producción de líquido ascítico	119
7. Caracterización isotípica de los anticuerpos monoclonales	120
8. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales	120
9. Especificidad	120
10. Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina	121
2.8. Técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA)	122
1. Técnica del ELISA Indirecto	122
2. Técnica del ELISA Sandwich	125
3. Técnica del ELISA Competitivo	127
4. Técnica del Inmunoblotting	128
IV. RESULTADOS	132
IV.1. FRACCIONAMIENTO DE LA CASEINA DE LA LECHE DE CABRA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO	133
1.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC)	133
1. Caracterización electroforética de las fracciones caseínicas purificadas por FPLC	133
1.2. Cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-celulosa	135
1.3. Cromatografía de intercambio catiónico en una matriz de S-Sepharose Fast-Flow	135
1. Caracterización electroforética de las fracciones caseínicas purificadas por cromatografía de intercambio catiónico	139
IV.2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA PARCIAL DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS	139
IV.3. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES	141
IV.4. OBTENCION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	143

4.1. Fusión celular	145
4.2. Selección de los de anticuerpos monoclonales de interés	145
4.3. Caracterización isotípica de los anticuerpos monoclonales seleccionados	146
4.4. Actividad de los anticuerpos monoclonales seleccionados, frente a las caseínas de la leche de cabra utilizando un ELISA Indirecto	146
4.5. Determinación de la especificidad y actividad del anticuerpo monoclonal B2B	151
 IV.5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LECHE DE CABRA EN MEZCLAS LÁCTEAS, UTILIZANDO MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)	155
5.1. Detección y cuantificación de leche cruda de cabra en la leche cruda de oveja	155
A. Técnica del ELISA Indirecto	155
B. Técnica del ELISA Sandwich	156
C. Técnica del ELISA Competitivo	156
D. Técnica del ELISA Indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina	159
5.2. Detección y cuantificación de leche cruda de cabra en la leche cruda de vaca	159
A. Técnica del ELISA Indirecto	159
B. Técnica del ELISA Competitivo	160
5.3. Influencia del tratamiento térmico en la detección y cuantificación de leche de cabra en leche cruda de oveja	160
A. Técnica del ELISA Indirecto	162
B. Técnica del ELISA Competitivo	162
5.4. Influencia del tratamiento térmico en la detección	

y cuantificación de leche de cabra en leche cruda de vaca	165
A. Técnica del ELISA Indirecto	165
B. Técnica del ELISA Competitivo	168
 IV.6. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA, EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y VACA, UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMA- TICOS (ELISA)	173
6.1. Detección y cuantificación de leche de cabra en quesos madurados de oveja	173
A. Técnica del ELISA Indirecto	174
B. Técnica del ELISA Competitivo	177
6.2. Detección y cuantificación de leche de cabra en quesos madurados de vaca	178
A. Técnica del ELISA Indirecto	181
B. Técnica del ELISA Competitivo	181
 V. DISCUSION	187
 V.1. OBTENCION, FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS CASEINA DE LA LECHE DE CABRA	188
 V.2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA PARCIAL DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS	193
 V.3. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS FRENTE A LA CASEINA α_{s2} DE LA LECHE DE CABRA	194
3.1. Obtención de anticuerpos policlonales	194
3.2. Obtención de anticuerpos monoclonales	196
 V.4. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN MEZCLAS LACTEAS, UTILIZANDO	

METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)	202
4.1. Detección y cuantificación de leche cruda de cabra en leche cruda de oveja	202
4.2. Detección y cuantificación de leche cruda de cabra en leche cruda de vaca	207
4.3. Influencia del tratamiento térmico en la detección y cuantificación de leche de cabra en leche cruda de oveja	208
4.4. Influencia del tratamiento térmico en la detección y cuantificación de leche de cabra en leche cruda de vaca	209
 V.5. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y VACA UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMA- TICOS (ELISA)	210
5.1. Detección y cuantificación de leche de cabra en quesos madurados de oveja	211
5.2. Detección y cuantificación de leche de cabra en quesos madurados de vaca	212
V.6. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO CON LOS DE OTROS INVESTIGADORES	212
 VI. CONCLUSIONES	216
 VII. TRABAJO FUTURO	219
 VIII. BIBLIOGRAFIA	222

CAPITULO I

EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Debido a la estacionalidad de la producción de las leches de oveja y cabra, así como al mayor precio de las mismas, ha sido frecuente la utilización fraudulenta de leche de vaca en la fabricación de quesos de oveja y cabra. Igualmente, el aumento creciente de la producción de leche de cabra, así como su menor coste en relación a la de oveja, ha determinado su incorporación en los quesos elaborados con leche de oveja. En nuestro país, tiene gran interés por tanto, no sólo la detección de leche de vaca, sino también la de leche de cabra en los quesos de mezcla. El poder determinar la materia prima (tipo de leche) que se ha utilizado en la fabricación de los quesos tiene gran importancia, no sólo para garantizar la genuidad de los quesos con Denominación de Origen o los quesos fabricados con leches puras, sino también en la determinación de los porcentajes de leche en los quesos de mezcla como, por ejemplo el Ibérico, que requiere un mínimo de un 25% de leche de las tres especies, ya que la legislación española establece normas de composición, debiendo declarar el porcentaje de los distintos tipos de leche empleados en su fabricación. El tema tiene gran repercusión económica ya que la Comunidad Europea es en estos momentos excedentaria en la producción de quesos, mientras los países comunitarios exigen estrictos controles de calidad, preocupando sobremanera la genuidad de los quesos de oveja y cabra.

Para establecer la procedencia animal de las leches en mezclas lácteas y quesos se han utilizado métodos cromatográficos (Prager, 1989), electroforéticos (Ramos y col., 1985; Addeo y col., 1989 b) e inmunológicos, basados en la utilización de técnicas como la de inmunodifusión en geles, recientemente modificada en nuestro departamento bajo la denominación de test de "COMIT" (García y col., 1989), inmunodifusión radial, inmunoelectroforesis en cohete (Radford y col., 1981), inmunoelectroforesis cruzada (Elbertzhaghen y Wenzel, 1987), contrainmunoelectroforesis (Bernhauer y col., 1983), inhibición de la hemaglutinación (Levieux, 1980) e inmunodotting (Aranda y col., 1988). El inconveniente de las técnicas citadas es que requieren materiales y equipos costosos, el realizarlas requiere mucho tiempo o una gran cantidad de anticuerpos purificados y, la mayoría de ellas, son sólo cualitativas o semicuantitativas.

Actualmente el desarrollo de técnicas inmunológicas basadas en la conjugación de marcadores sensibles a los anticuerpos, entre las que se incluyen las inmunoenzimáticas (ELISA), constituyen una alternativa interesante a las técnicas físico-químicas de análisis de alimentos. Las ventajas más sobresalientes de las técnicas inmunológicas son: a) su elevada sensibilidad, debido al empleo de marcadores que potencian su capacidad de detección, b) elevada selectividad debido a la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, c) pequeño coste del material utilizado, en comparación con el de otras técnicas y d) la rapidez y posibilidad de automatización del método, lo que permite analizar un número elevado de muestras en poco tiempo.

La mayoría de los métodos inmunoenzimáticos descritos para la identificación de especies en mezclas lácteas y en quesos, utilizan anticuerpos policlonales frente a las proteínas séricas de la leche (García y col., 1990; 1991), las caseínas totales (Rodríguez y col., 1990; 1993), inmunoglobulinas bovinas (Sauer y col., 1991) o péptidos sintéticos (Rolland y col., 1993; 1995). Sin embargo, los inconvenientes asociados a la utilización de anticuerpos policlonales radican en la disponibilidad limitada de los mismos y en la necesidad de purificarlos para eliminar reacciones cruzadas y que posean una especificidad adecuada. Además, la purificación de los inmunoseros por afinidad es larga y costosa y los anticuerpos purificados constituyen una mezcla de inmunoglobulinas, que pueden variar en su afinidad por el antígeno.

Es por ello, que el objetivo principal de nuestro trabajo ha consistido en la obtención y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de la leche de cabra, con el fin de utilizarlos posteriormente en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que permitan la detección y cuantificación de la leche de cabra en mezclas lácteas frescas y quesos madurados.

No obstante, para alcanzar el objetivo propuesto, deben cumplirse los siguientes objetivos parciales:

- (1). Fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra por cromatografía líquida rápida (FPLC) y cromatografía de intercambio iónico, e identificación de las fracciones más reactivas frente a los inmunoseros anti-caseínas de leche de cabra (anti CC), purificados por cromatografía de afinidad frente a los extractos liofilizados de caseínas de vaca y oveja.
- (2). Inmunización de ratones Balb/c, con la fracción caseínica más inmunoreactiva de la leche de cabra y fusión de los linfocitos, extraídos del bazo de los ratones mejor inmunizados, con células de mieloma de ratón.
- (3). Identificación de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales y clonación, expansión y congelación de los específicos frente a la leche de cabra, así como identificación de la clase y subclase de los anticuerpos monoclonales de interés.
- (4). Producción a gran escala de los anticuerpos monoclonales específicos y purificación de los mismos por precipitación selectiva con sulfato amónico o utilizando técnicas cromatográficas específicas.

- (5). Utilización de los anticuerpos monoclonales purificados para detectar y cuantificar la presencia de leche de cabra en mezclas lácteas frescas y quesos madurados, mediante el desarrollo y puesta a punto de diversas técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

CAPITULO II

INTRODUCCION

II.1. LA LECHE

II.1.1. GENERALIDADES

Según el Reglamento de Centrales lecheras y otras industrias lácteas (B.O.E., 240 del 7 de Octubre de 1966) y el Código Alimentario Español vigente, la leche se define como: "El producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas", indicando que esta denominación se refiere exclusivamente a la leche de vaca; para designar las leches producidas por hembras de otros animales se indicará el nombre de la especie correspondiente.

La leche es desde el punto de vista químico un sistema complejo formado por 2 fases líquidas físicamente homogéneas: una fase lipídica y una fase acuosa entre las que se reparten los diversos constituyentes. La composición de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades. Los principales componentes de la leche son el agua, lípidos, carbohidratos, proteínas, sales y una gran lista de componentes misceláneos, que se encuadran en cuatro categorías: componentes específicos del órgano y de la especie (la mayoría de las proteínas y de los lípidos), componentes específicos del órgano pero no de la especie (la lactosa), componentes específicos de especie pero no del órgano (algunas proteínas) y componentes no específicos (agua, sales y vitaminas) (Jeness, 1988).

II.1.2. DIFERENCIAS DE COMPOSICION DE LAS LECHE DE VACA, OVEJA Y CABRA

La composición química de la leche varía según la especie animal. En la Tabla II.1., se muestra una clasificación de los principales componentes de la leche. Es interesante destacar que además de las variaciones debidas a la especie, los distintos componentes de la leche se encuentran en proporciones variables dependiendo de numerosos factores y condiciones como la raza, el estado fisiológico del animal (etapa de lactación, edad, estado nutricional, variaciones estacionales) y factores ambientales, si bien se considera que la composición y propiedades de la leche son cualitativamente constantes.

Las leches de vaca, oveja y cabra se diferencian en algunas características, unas fácilmente observables y otras relacionadas con sus particularidades físicas y químicas. La

Tabla II.1. Variaciones en la Composición Química de la Leche, según las Especies Consideradas

		COMPOSICION g/100g						
Especies	Nombre Científico	Agua	Grasa	Caseína	Proteínas séricas	Lactosa	Cenizas	Energía Kcal/100 g
Humana	<i>Homo sapiens</i>	87,1	4,5	0,4	0,5	7,1	0,2	72
Conejo	<i>Orytolagus cuniculus</i>	67,2	15,3	9,3	4,6	2,1	1,8	202
Rata	<i>Rattus noruegicus</i>	79	10,3	6,4	2	2,6	1,3	137
Caballo	<i>Equus caballus</i>	88,8	1,9	1,3	1,2	6,2	0,5	52
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	81,2	6,8	2,8	2	5,5	1	102
Vaca	<i>Bos taurus</i>	87,3	3,9	2,6	0,6	4,6	0,7	66
Oveja	<i>Ovis aries</i>	82	7,2	3,9	0,7	4,8	0,9	102
Cabra	<i>Capra hircus</i>	86,7	4,5	2,6	0,6	4,3	0,8	70

Fuente: Jeness, 1988

leche de vaca es un líquido opaco, blanco mate, más o menos amarillento según el contenido en β -caroteno de la materia grasa. Tiene un olor poco marcado y su gusto es agradable y dulzón (Assenat, 1991). Teniendo en cuenta que la leche de vaca se considera, si no como referencia, sí como la más estudiada y conocida, las comparaciones entre las leches de interés se establecerán especialmente con ella.

II.1.2.1. LECHE DE OVEJA

La leche de oveja es de un color blanco nacarado, semejante a la porcelana. Su opacidad es mayor que la de las leches de vaca y cabra y su viscosidad es mayor que la de la leche de vaca. La leche de oveja tiene un olor "sui generis", característico del animal que la produce y poco marcado en la leche recogida en buenas condiciones.

La grasa es el componente de la leche de oveja que muestra mayores variaciones. Parkash y Jeness (1968) determinaron que el diámetro del glóbulo graso es de 3,30 micras en la leche de oveja y de 4,55 en la leche de vaca. El color de la leche de oveja es netamente blanco, debido a la poca presencia de β -caroteno (Laxminarayana y Dastur, 1968). Los lípidos de la leche de oveja se caracterizan por su elevado contenido en ácidos grasos saturados de 6 a 12 átomos de carbono, con una proporción particularmente elevada del ácido caprílico, de 1,7 a 4% en peso de los ácidos grasos totales en la leche de oveja, frente a sólo el 1-1,8% de la leche de vaca. Lo mismo sucede con el ácido cáprico, de 4 a 11% en la leche de oveja frente al 2,1-3,5% de la leche de vaca (Assenat, 1991).

El análisis de los ácidos grasos, revela algunas diferencias, que parece que son específicas de la leche de oveja (Kuzdzal-Savoie y Kuzdzal, 1970). Los ácidos comprendidos entre el mirístico (C14) y el pentadenoico (C15) se encuentran en pequeña cantidad, lo que se ha considerado por diversos autores en la detección de posibles fraudes. El olor y gusto característico de la leche de oveja están en estrecha relación con el contenido de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono. El aroma particular de los quesos de leche de oveja se debe a la composición de los lípidos de esta leche. En la leche de oveja existen menos triglicéridos de cadena larga y más de cadena corta que en la leche de vaca mientras la proporción de fosfolípidos de la leche de oveja parece ser ligeramente mayor en la leche de oveja que en la de vaca. Ya se ha mencionado que los quesos obtenidos con leche de oveja presentan, la mayoría de ellos, características específicas de sabor y gusto, lo que parece deberse fundamentalmente a la lipólisis del componente graso. Los ácidos caprílico y cáprico se encuentran en la leche de oveja en cantidades relativamente importantes, por lo que es posible que influyan en este proceso, bien como sustancias activas o como precursores de otras sustancias (Assenat, 1991).

La leche de oveja es especialmente rica en componentes queseros. Es habitual decir que, para cantidades de leche idénticas, se obtiene de media dos veces más de queso con la leche de oveja que con la de vaca. La leche de oveja produce una cuajada dura y la pasta es, en general más blanca, siendo relativamente difícil la oposición de sabores amargos, lo que se atribuye a la menor proporción de caseínas α_s respecto a la caseína total. Lo más notable en cuanto a la composición de la leche de oveja, en comparación con la de vaca y cabra, es que es unas 2 veces más rica en grasa y en nitrógeno total. Su contenido en lactosa es igual o inferior al de la leche de vaca.

II.1.2.2. LECHE DE CABRA

La leche de cabra es de un color blanco mate, debido a que no contiene β -caroteno; recién ordeñada tiene un olor neutro, aunque a veces al final de la lactación se aprecia un denominado cáprico. El sabor dulzón es particular de esta leche. La viscosidad de la leche de cabra es más baja que la de vaca (Parkash y Jeness, 1968). Como las concentraciones de grasa y proteínas de la leche de cabra son inferiores a las de la leche de vaca, su valor energético es más bajo. En cuanto a su valor vitamínico, la leche de cabra no contiene carotenos y se caracteriza por la ausencia o la presencia de una cantidad pequeña de vitamina E.

Los glóbulos grasos de la leche de cabra son más pequeños que en la de vaca, pero la composición y propiedades de ambas membranas son similares. Un 65% de los glóbulos grasos tienen un diámetro inferior a 3 micras frente a un 43% en la leche de vaca, con un diámetro medio muy próximo al de la leche de oveja, de 3,5 micras y de 3,3 micras respectivamente. A igualdad de concentración de grasa, la leche de cabra tiene un número de glóbulos grasos dos veces mayor que la leche de vaca y un diámetro medio inferior de 3,53 micras y de 1,99 micras para la leche de vaca y de cabra, respectivamente (Fahmi y col., 1956).

Los triglicéridos representan el 98,99% de los lípidos de la leche, siendo los mono y diglicéridos poco frecuentes, representando un 0,5% del total. La leche de cabra tiene un contenido en ácidos grasos prácticamente doble que el de la leche de vaca (16,6% frente al 8%). El porcentaje de ácidos grasos saturados varía entre el 65,9% y el 71,9%. Si se estudian los ácidos grasos en función de la longitud de su cadena de átomos de carbono de C4 a C12, la leche de cabra y la de oveja son similares, con un 20% y un 24%, respectivamente, frente al 14% de la leche de vaca. La diferencia entre las leches de cabra y vaca se encuentra esencialmente en la proporción de los ácidos grasos C8, C10 y C12, que

para la leche de vaca y cabra son de 1,8 y 3,6%, de 4,0 y 3,2% y de 8,7 y 4,7%, respectivamente.

En la leche se distinguen dos grupos de compuestos nitrogenados: las proteínas y las sustancias no proteicas o nitrógeno no proteico (NNP), que en la leche de vaca representan, respectivamente, el 95% y el 5%. La leche de oveja es pobre en NNP, siendo en esto similar a la de vaca (6,8%). Por el contrario, en la leche de cabra la concentración de NNP es más elevada que en las otras dos, del orden del 8,7% (Mahieu y col., 1976, 1977; Mohrand-Fehr y Flamant, 1983).

II.2. COMPOSICION PROTEICA DE LA LECHE

Las proteínas lácteas tienen una gran importancia en la nutrición humana e influyen en el comportamiento y las propiedades de los productos que las contienen, por lo que se han estudiado ampliamente. La mayoría de los estudios se han realizado en la leche de vaca, extrapolando los resultados a las demás especies. La fracción proteica de la leche se encuentra en la fase acuosa, bien en estado soluble, constituida por diferentes polímeros proteicos hidrófilos (proteínas del lactosuero) o bien en estado coloidal, constituida por partículas sólidas, en suspensión, que difunden la luz y dan un color blanco opaco (micelas de caseína). Las micelas de caseína son complejos orgánicos constituidos por proteínas laxas y enmarañadas, mientras que las proteínas solubles se encuentran como cadenas enrolladas y cerradas (Walstra y Jeness, 1987).

El grupo denominado "caseínas" consta de 4 tipos de cadenas polipeptídicas α_{s1} , α_{s2} , β y κ , además de algunos derivados procedentes de la proteólisis de estas cadenas. El 95% de la caseína de la leche se encuentra agrupada en las micelas de caseína de 20-300 μm de diámetro, asociada con iones calcio y fosfato. En el otro grupo de proteínas, denominado "proteínas del lactosuero" se incluyen la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina, la albúmina sérica bovina, las inmunoglobulinas, las proteínas de la membrana del glóbulo graso, los enzimas y otras proteínas minoritarias como transferrina, lactoferrina y β_2 -microglobulina (Tabla II.2.).

II.2.1. NOMENCLATURA DE LAS PROTEINAS LACTEAS

A lo largo del siglo XIX y principios del actual, las proteínas conocidas se limitaron a las caseínas y a la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, aunque posteriormente se han

Tabla II.2. Clasificación y Distribución de las Proteínas de La Leche de Vaca (30-35 g/l)

1. CASEINAS (24-28 g/l)

Caseínas α_{s1}	(12-15 g/l)
Caseínas α_{s2}	(3-4 g/l)
Caseínas β	(9-11 g/l)
Caseínas κ	(2-4 g/l)

2. PROTEINAS DEL LACTOSUERO

β -Lactoglobulina	(2-4 g/l)
α -Lactoalbúmina	(0,6-1,7 g/l)
Seroalbúmina bovina	(0,2-0,4 g/l)
Inmunoglobulinas	(0,5-1,8 g/l)

3. PROTEINAS DE LA MEMBRANA DEL GLOBULO GRASO

4. PROTEINAS MINORITARIAS

Transferrina
 Lactoferrina
 β_2 -Microglobulina
 Glicoproteínas
 Ceruloplasmina
 Inhibidor de Tripsina
 Quininógeno
 Proteína ligante de Folato
 Proteína ligante de Vitamina B₁₂

5. ENZIMAS

Fuente: Whitney, 1988

identificado y caracterizado numerosas proteínas. El Comité de la Asociación Americana de Ciencia de la Leche y Productos Lácteos (ADSA), ha desarrollado un sistema de clasificación de las proteínas de la leche para su nomenclatura y clasificación (Eigel y col., 1984), incluyendo las proteínas minoritarias y los enzimas. Excepto para la seroalbúmina bovina, las inmunoglobulinas y las proteínas de la membrana del glóbulo graso, la nomenclatura empleada en esta clasificación consiste en una letra griega, con o sin subíndice, que identifica la familia de proteínas. Las variantes genéticas se indican por una letra arábiga mayúscula, con o sin superíndice y las modificaciones post-traduccionales, se indican por una notación alfanumérica seguida de la letra que designa la variante génica.

Un problema importante para denominar a las proteínas lácteas, de especies distintas a la bovina, es determinar su homología. En biología donde el término homología significa ancestros comunes, se dice que las proteínas de especies distintas son homólogas si proceden de un ancestro común. Otro criterio de homología es la existencia de inmunoreactividad cruzada, por lo que las proteínas homólogas muy próximas poseen determinantes comunes y por lo tanto exhiben reacciones inmunológicas cruzadas, pero la ausencia de reactividad cruzada no implica necesariamente la carencia de homología. La homología puede deducirse de la función biológica y de la inmunoreactividad cruzada, aunque el criterio definitivo es homología en la secuencia aminoacídica (Swaigood, 1982). Las caseínas, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, se nombran de acuerdo a sus homólogos en la especie bovina, mientras la albúmina sérica se identifica por su movilidad electroforética, inmunoreactividad y su tamaño molecular. Las inmunoglobulinas se identifican y denominan por su inmunoreactividad y los enzimas se identifican y nombran por su especificidad biológica.

Está claramente establecido que la heterogeneidad de una familia de proteínas de la misma especie, deriva de las modificaciones post-traduccionales (fosforilación incompleta de las caseínas, glicosilación de la caseína κ , proteólisis parcial por la plasmina) y del polimorfismo genético. Todas las proteínas de la leche presentan polimorfismo genético (Martín, 1993); hasta ahora todas las variantes conocidas difieren en los radicales ionizables y, originalmente, se detectaron por variaciones en la migración electroforética de las proteínas de leches de vacas distintas. En la mayoría de los casos, la localización de las sustituciones se ha establecido con técnicas de secuenciación de los péptidos de interés. En algunas de las proteínas de la leche existen también variantes no genéticas, debido a diferencias en el número y localización de los grupos fosfato y glicosilo, que se unen a las cadenas polipeptídicas después de la traducción.

II.2.2. EL POLIMORFISMO GENETICO DE LAS LACTOPROTEINAS

El estudio de los determinantes genéticos de las proteínas de la leche es relativamente reciente, (Bonsing y Mackinlay, 1987; Rosen, 1987; Mercier y col., 1991 y Mercier y Vilotte, 1993). El polimorfismo genético de las caseínas se traduce en la posibilidad, para cada una de ellas, de existir bajo diversas formas derivadas de la misma forma original por mutación. Estas variantes designadas por las letras A, B, C, etc., se diferencian entre sí por modificaciones mínimas en la estructura de las cadenas polipeptídicas donde por ejemplo, un aminoácido es reemplazado por otro. Sin embargo, estas pequeñas modificaciones pueden traducirse en cambios importantes de sus propiedades: la sustitución de un aminoácido por otro puede acarrear una modificación de las estructuras secundaria o terciaria de la proteína. Las variantes genéticas pueden poseer, por tanto, implicaciones interesantes.

En una población, se habla de polimorfismo genético cuando existen, en un locus de estructura determinada, al menos 2 alelos. El polimorfismo genético de las proteínas en general y de las lactoproteínas en particular, se detecta por electroforesis en geles que permiten la separación de 2 formas de una misma proteína (o 2 variantes) cuando difieren en su carga o su tamaño, lo que ocurre como consecuencia de mutaciones en las secuencias codificantes de un gen (una parte de los exones) y que no representan más que una débil parte (3 a 7% para los genes de las caseínas) de la totalidad del gen. El polimorfismo observado en una proteína solamente refleja parcialmente el polimorfismo existente a nivel genómico. Solamente 3 mutaciones de cada 4 originan la sustitución de un aminoácido por otro. Además, alrededor de dos tercios de las sustituciones de las proteínas no modifican su carga neta y no pueden ser revelados por electroforesis. Evidentemente, las mutaciones se producen igual y estadísticamente en número más elevado, en las secuencias no codificantes de los genes (intrones, secuencias promotoras y reguladoras), que no son identificables por el análisis estructural de la proteína, pero que pueden tener un efecto considerable sobre su síntesis, como ocurre en el caso de las caseínas caprinas (Martín, 1993).

Es, en la especie bovina, donde más se ha estudiado el polimorfismo de las lactoproteínas, por la importancia económica de la leche de esta especie. Sobre el reparto y la frecuencia de las diversas variantes genéticas, se han realizado recientemente diversas revisiones (Mercier y Grosclaude, 1992; Ng-Kwai-Hang y Grosclaude 1992).

II.2.2.1. ESTRUCTURA Y LOCALIZACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS CASEINAS

El fuerte vínculo existente entre los genes que codifican las caseínas α_{s1} , y β fue demostrado en 1964 por Grosclaude y col. (1964). Los estudios mendelianos sobre el polimorfismo genético de las caseínas (Grosclaude y col., 1964, 1965, 1978; Larsen y Thymann, 1966) permitieron establecer que las caseínas se encuentran codificadas en 4 genes estrechamente ligados. Estos 4 locus se comportan como una única entidad genética, en la que la combinación de los alelos, casi indisociables, se denomina "haplotipo". Estas observaciones, fin de la genética clásica, se han confirmado recientemente por el análisis de los fragmentos de ADN genómico, por electroforesis en geles de agarosa (Threadgill y Womack, 1990; Ferreti y col., 1990). Estos autores han desarrollado el mapa de un fragmento de 250 a 300 Kb (Figura II.1.), que posiciona los 4 locus en el siguiente orden : α_{s1} , α_{s2} , β y κ . Estos 4 genes se han localizado posteriormente, por técnicas de hibridación "in situ", en el cromosoma 4 de los bovinos, ovinos y caprinos (Hayes y col., 1993a).

Los genes que codifican las caseínas sensibles al calcio (α_{s1} , α_{s2} y β), poseen una organización similar y dominios estructurales comunes, confirmando la hipótesis de un origen filogenético común, como se desprende de la comparación de las proteínas resultantes de su expresión (Gaye y col., 1977). Un análisis más detallado y su comparación interespecífica, revelan una organización estructural muy conservada. Así, independientemente de la especie considerada, la unidad de transcripción del gen de la caseína β está formada, invariablemente, por 9 exones. Las únicas diferencias notables derivan del tamaño de algunos intrones, debido a la presencia de secuencias repetidas.

La determinación de la organización estructural de los genes de las caseínas α_{s1} y α_{s2} es muy reciente (Koczan y col., 1991; Groenen y col., 1993). Sus unidades de transcripción se componen, respectivamente, de 19 y 18 exones. Sin embargo, la estructura del gen de la caseína κ bovina es sensiblemente diferente de la de los genes de las caseínas sensibles al calcio α_{s1} , α_{s2} y β .

II.2.2.2. ESTRUCTURA Y LOCALIZACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEINAS SERICAS

El gen que codifica la α -lactoalbúmina bovina y caprina se ha localizado en el cromosoma 5 (Hayes y col., 1993 b), mientras que el cromosoma portador del gen

específico de la β -lactoglobulina se ha identificado en el cromosoma 11 (Hayes y Petit, 1993). Las unidades de transcripción de los genes que codifican la α -lactoalbúmina (Villote y col., 1987) y la β -lactoglobulina (Alexander y col., 1993) son de un tamaño relativamente pequeño (2 y 4,7 Kb respectivamente), comparadas con las de los genes específicos de las caseínas, comprendidos entre 8,5 kb para la caseína β (Bonsing y col., 1988) y 18,5 Kb para la caseína α_{S1} (Groenen y col., 1993) (Figura II.2.).

II.2.3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES RESPONSABLES DE LA HETEROGENEIDAD DE LAS PROTEÍNAS

En algunas proteínas lácteas, existen también variantes no genéticas debido a diferencias en el número y localización de los grupos fosfato y glicosilo que se unen a las cadenas polipeptídicas después de la traducción. Las modificaciones post-traduccionales de las que son objeto las caseínas (fosforilación, glicosilación y proteólisis) son, en parte, responsables de la multiplicidad de los productos observados.

Las principales proteínas de la leche, las caseínas α_{S1} , α_{S2} , β y κ así como las proteínas solubles β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, se sintetizan en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico, bajo la forma de una pre-proteína con una extensión suplementaria de 15 a 21 residuos aminoácídicos en la parte N-terminal. Este fragmento, o péptido señal, permite el paso a través de la membrana lipoproteica del retículo y después es eliminado. La proteína láctea sintetizada migra entonces hacia el aparato de Golgi, del que se liberan las vacuolas que contienen proteínas, progresando hacia la membrana plasmática del acinus, con la que se fusionan. Después, se abren para verter su contenido en la luz del acinus y dar lugar a la leche (Ribadeau-Dumas, 1981). Durante el desplazamiento intracelular se produce la fosforilación o la glicosilación de las proteínas implicadas.

Las proteínas del lactosuero presentan una estructura globular compacta mientras que por el contrario, la estructura tridimensional de las caseínas parece permitir su asociación en partículas esféricas estructuradas, las micelas, en las cuales que el ensamblaje y la cohesión están asegurados reversiblemente por las uniones fosfocálcicas. El carácter reversible de esta estructura, que asegura el transporte bajo forma soluble de los iones fosfato y calcio, requiere la fijación covalente de grupos prostéticos. Estas modificaciones post-traduccionales, realizadas enzimáticamente en el aparato de Golgi, son en gran parte responsables de la fuerte heterogeneidad que caracteriza a las caseínas.

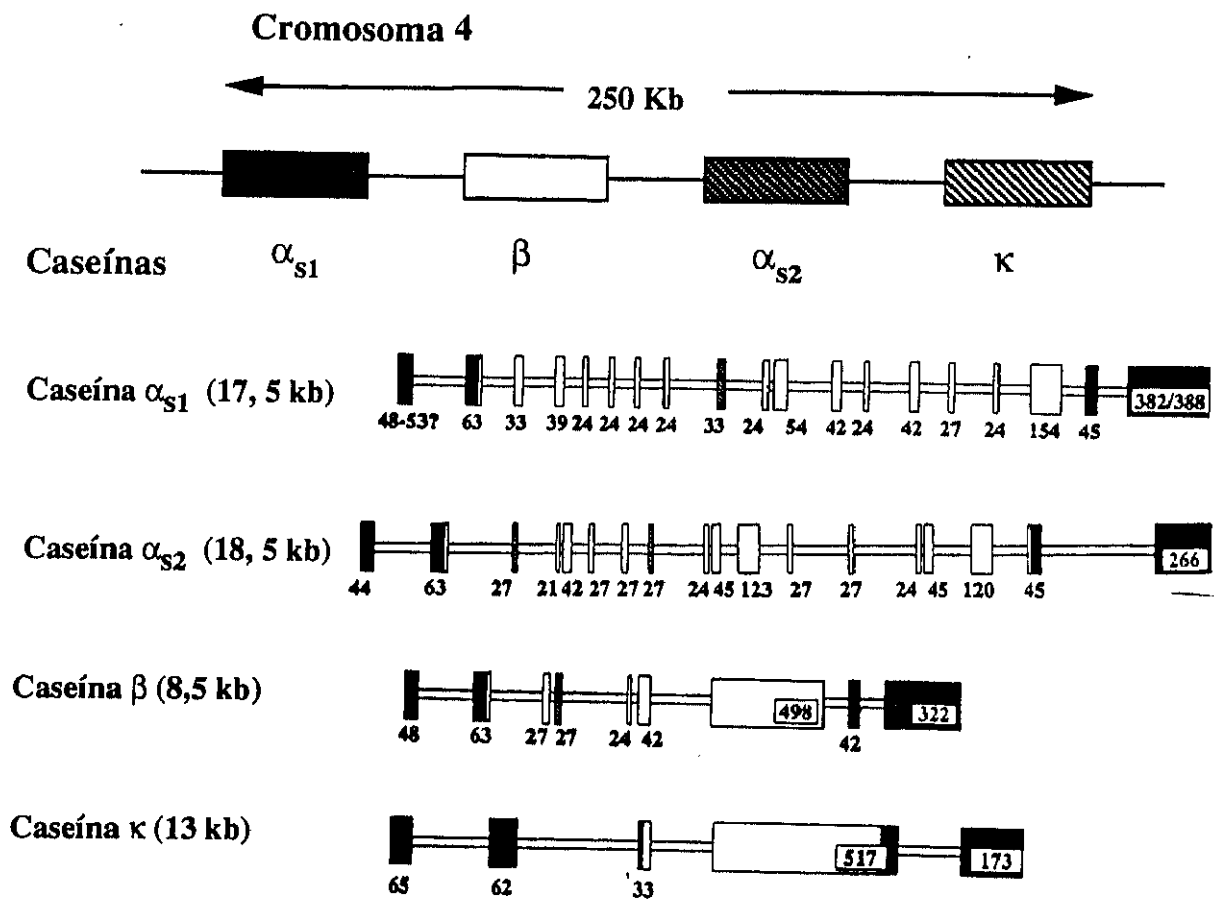


Figura II.1. Estructura y localización de los genes que codifican las caseínas (Martín, 1993)

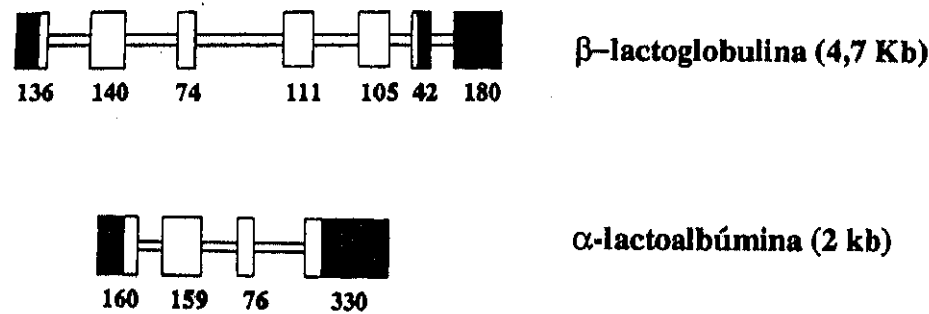


Figura II.2. Organización estructural de los genes que codifican las dos principales lactoproteínas séricas (Martín, 1993)

La fosforilación de las caseínas tiene lugar post-traduccionalmente en el aparato de Golgi, donde se han identificado los enzimas casein-quinasas (Bingham, 1979). La comparación de los lugares de fosforilación en varias caseínas, permite conocer que la fosforilación de las caseínas se encuentra catalizada por una quinasa que reconoce específicamente la secuencia tripeptídica Ser/Thr-X-A, donde A representa un residuo ácido, preferentemente de tipo glutámico (Glu), raramente aspártico o un serín-fosfato y la X corresponde a un residuo aminoacídico cualquiera (Mercier, 1981). Por otra parte, el reconocimiento de esta secuencia no es suficiente para determinar una modificación, siendo conveniente que estos residuos estén accesibles para la interacción con las casein-quinasas, es decir, expuestos en estructuras desordenadas como sucede en el caso de las caseínas, mientras que estas secuencias en la α -lactoalbúmina (Ser 76) y β -lactoglobulina (Ser 110), se encuentran ordenadas en su estructura.

Todas las caseínas se encuentran fosforiladas en mayor o menor grado y todos los residuos fosforilados se han identificado como serina, excepto en el caso de la $\alpha_{S1}D$ que contiene, además, un residuo fosfotreonilo. Los lugares de fosforilación están dispersos o concentrados en uno (α_{S1} y β) ó 2 (α_{S2}) segmentos cortos de cadenas polipeptídicas, para formar los lugares de fosforilación múltiple, conteniendo de 3 a 5 residuos fosfoserilo consecutivos. Estos lugares de fosforilación múltiple son los responsables de la sensibilidad al calcio de las caseínas α_{S1} , α_{S2} , y β , y constituyen, verdaderamente, los puntos de anclaje de los puentes fosfocálcicos que unen a las submicelas entre sí. La familia de las caseínas α_{S2} tiene más variabilidad en cuanto a la extensión de la fosforilación ya que su número varía de 10 a 13 residuos (Brignon y col., 1977).

El carácter hidrófilo de la caseína κ se encuentra reforzado por la glicosilación, lo que contribuye a incrementar la complejidad del sistema, identificándose al menos 10 formas diferentes en la especie bovina (Vreeman y col., 1988) y, al menos, 5 en la especie caprina (Addeo y col., 1988). La glicosilación de la caseína κ tiene lugar probablemente en el aparato de Golgi (Loucheaux-Lefebvre y col., 1978).

Como conclusión, conviene señalar que las lactoproteínas se sintetizan en forma de precursores y que durante su traducción en el retículo endoplásmico las cadenas polipeptídicas son amputadas de su péptido señal (15-21 residuos aminoácidos). La estructura de estos péptidos es extremadamente conservada (Mercier y Gaye, 1980), en particular en las caseínas sensibles al calcio (α_{S1} , α_{S2} y β). Por otra parte durante el almacenamiento de la leche en refrigeración, a menudo se observa la aparición de productos de degradación y de fracciones caseínicas minoritarias: las caseínas γ , R, S y TS que

proceden de la proteólisis de la caseína β (Gordon y col., 1972) por la plasmina (Eigel y col., 1979).

II.3. CASEINAS

Es difícil definir las caseínas de forma que se incluyan todas las proteínas que pertenecen a esta clase y se excluyan las demás, aunque la propiedad común de su escasa solubilidad a pH 4,6, sirve de base para una definición conveniente y operativa. A este pH precipitan todas las caseínas, salvo algunos derivados proteolíticos, mientras su solubilidad en estas condiciones es mucho menor que la de cualquier proteína del suero, lo que permite una neta separación entre unas y otras. Bajo el punto de vista de su composición, todas las cadenas polipeptídicas de caseína tienen al menos un enlace éster-fosfato por molécula, mientras que ninguna de las proteínas del suero los tiene. Las caseínas representan la fracción mayoritaria de las proteínas de la leche y se distinguen por una serie de propiedades estructurales características importantes por lo que respecta a su comportamiento químico y tecnológico (Jaubert y Martín, 1992). La aptitud de la leche a la coagulación, la reología de las cuajadas y ciertos comportamientos del afinado, están directamente ligados con la estructura y composición de la micela de caseína

Debido a su alto contenido en fosfato, las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β se unen fuertemente al calcio y precipitan a concentraciones de Ca^{2+} superiores a 6 mM. Sin embargo, la caseína κ , con sólo un residuo fosfato, es soluble a elevadas concentraciones de Ca^{2+} y reacciona hidrofóbicamente con el resto de las caseínas, llegando a estabilizar hasta 10 veces el peso de las caseínas sensibles al calcio, evitando su precipitación mediante la formación de agregados coloidales llamados micelas.

II.3.1. MICELA DE CASEINA

Más del 95% de las caseínas de la leche se encuentran agrupadas en micelas, formadas por un 94% de proteína y un 6% de otras sustancias, principalmente calcio, fosfato, algo de magnesio y citrato. Las micelas son esféricas, de un diámetro de entre 30-50 nm y un tamaño molecular de unos 10^8 daltons, formadas por submicelas esféricas de unos 10^6 daltons, unidas mediante enlaces de fosfato cálcico, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Aunque la estructura exacta de las submicelas se desconoce, uno de los últimos modelos (Schmidt, 1982), propone que las caseínas sensibles al calcio, las α_{s1} , α_{s2} y β , interaccionan hidrofóbicamente formando el núcleo de la submicela, mientras

que la caseína κ se localiza predominantemente en la superficie (Figura II.3.). Cerca de 2/3 de la molécula de la caseína κ es hidrofóbica y reacciona hidrofóticamente con las proteínas del núcleo de la submicela, mientras que la región C-terminal, hidrofílica, se orienta hacia el exterior. Las submicelas se agregarían, de modo que aquellas más ricas en caseína κ se concentran en la superficie. Se cree que las micelas se estabilizan mediante un potencial eléctrico y por el impedimento estérico que causan los segmentos C-terminales de la caseína κ , que impiden su agregación.

II.3.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS CASEINAS

De las proteínas alimentarias, las proteínas de la leche de vaca, son probablemente las mejor caracterizadas química, física y genéticamente. Las caseínas, aunque con una estructura menos ordenada y más flexible que las típicas proteínas globulares del suero, poseen una estructura secundaria y terciaria. La estructura primaria de la mayoría de las variantes genéticas de cada una de las fracciones caseínicas mayoritarias, se ha establecido, bien por secuenciación de la proteína o del DNA cromosómico (Swaigood, 1992).

La composición química de las variantes genéticas mayoritarias de cada una de las caseínas, se muestra en la Tabla II.3., de la que se deduce que una característica diferencial de las caseínas respecto de las proteínas globulares del lactosuero, es la presencia de residuos de fosfoserina y un número elevado de residuos prolina. Asimismo, destaca la ausencia de residuos de cisteína en las caseínas α_{s1} y β . El conocimiento de la composición aminoacídica permite el cálculo de un número de parámetros físico-químicos, como la carga molecular, que se muestra en la Tabla II.4. Otra característica que, además, es responsable de sus propiedades funcionales es el carácter anfótero de sus estructuras primarias (Swaigood, 1982), fundamentalmente de las caseínas sensibles al calcio (α_{s1} , α_{s2} y β) debido a la fosforilación y a la existencia de agrupamientos aniónicos de residuos de serina y treonina en sus dominios polares, alternando con secuencias hidrofóbicas con pocos residuos cargados, divididos casi por igual entre cationes y aniones, por lo que la estructura terciaria de las caseínas estaría constituida por dos dominios, uno hidrofóbico globular y otro polar muy cargado (Swaigood, 1982). En cambio, el dominio polar de la caseína κ , aunque fuertemente aniónico, no contiene fosfoserina, por lo que esta característica estructural sería la responsable de las interacciones con el calcio que definen la estructura micelar.

Debido a que la observación directa de la estructura de las caseínas por cristalografía con rayos X no es posible, se han utilizado técnicas espectrales y algoritmos para predecir

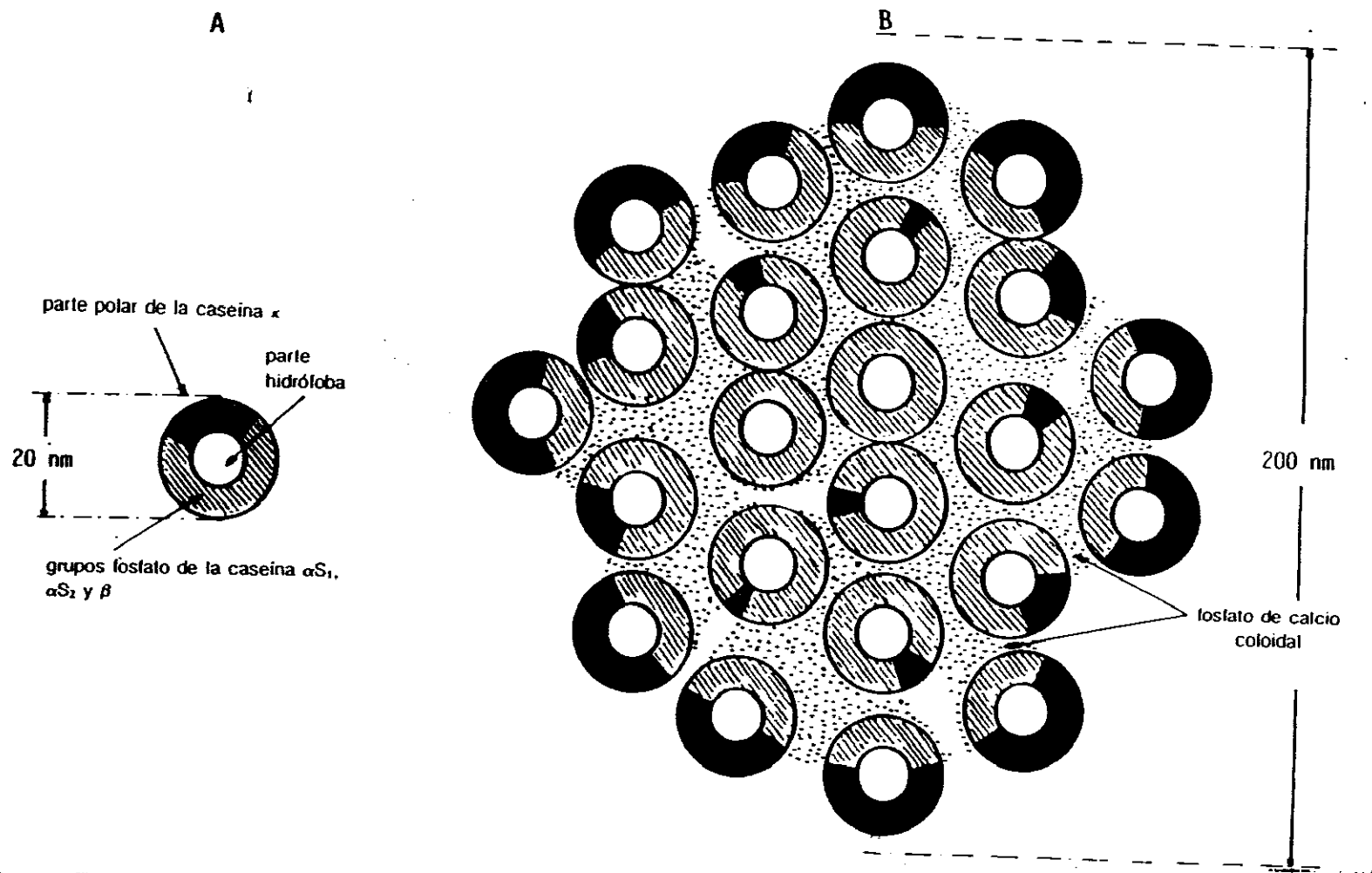


Figura II.3. Modelo de la subunidad micelar (A) y de la micela de caseínas (B) (Luquet, 1991)

Tabla II.3. Composición Química de las Variantes Genéticas Mayoritarias de las Caseínas Según su Estructura Primaria

AMINOACIDOS	α_{s1} B-8P	α_{s2} A-11P	κ B-1P	β A2-5P
Asp	7	4	3	4
Asn	8	14	8	5
Thr	5	15	14	9
Ser	8	6	12	11
SerP	8	11	1	5
Glu	25	24	12	19
Gln	14	16	14	20
Pro	17	10	20	35
Gly	9	2	2	5
Ala	9	8	15	5
Cys	0	2	2	0
Val	11	14	11	19
Met	5	4	2	6
Ile	11	11	13	10
Leu	17	13	8	22
Tyr	10	12	9	4
Phe	8	6	4	9
Trp	2	2	1	1
Lys	14	24	9	11
His	5	3	3	5
Arg	6	6	5	4
Pyr o Glu	0	0	1	0
Residuos totales	199	207	169	209
Peso molecular	23,623	25,238	19,006	23,988

Fuente: Swaisgood, 1993

Tabla II.4. Características Físico-Químicas de las Caseínas Según su Composición

	PROTEINA	CARGA a pH 6,6	pH ISOIONICO
α_{s1}	A-8P	-21	4,94
	B-8P	-21,9	4,94
	C-8P	-20,9	4,97
	D-9P	-23,5	4,88
α_{s2}	A-10P	-12,2	5,45
	A-11P	-13,8	5,37
	A-12P	-15,5	5,3
	A-13P	-17,1	5,23
β	A ³ -5P	-13,8	5,07
	A ² -5P	-13,3	5,14
	A ¹ -5P	-12,8	5,22
	B-5P	-11,8	5,29
	C-4P	-9,2	5,46
κ	A-1P	-3	5,61
	B-1P	-2	5,9

Fuente: Swaisgood , 1993

su estructura secundaria a partir de su estructura primaria. Los resultados obtenidos sugieren que la afirmación frecuente de que las caseínas carecen de estructura secundaria es incorrecta (Swaigood, 1982). Recientemente, también se han realizado intentos para predecir su estructura terciaria a partir de su estructura primaria mediante el desarrollo de modelos moleculares (Kumosinsky y col., 1991 a, 1991 b). Las estructuras obtenidas sugieren que los agrupamientos de residuos similares y la presencia de un gran número de residuos de prolina uniformemente distribuidos, hacen que las estructuras secundaria y terciaria de las caseínas sean abiertas y desordenadas.

La flexibilidad de la estructura de las caseínas se refleja por su susceptibilidad a la proteólisis, lo cual origina dramáticos cambios funcionales (Swaigood y Catignani, 1987). La estructura de la caseína β es aparentemente abierta y flexible en la región entre el N-terminal del dominio polar y el C-terminal del dominio hidrofóbico, por lo que la acción de la plasmina sobre esta caseína (Eigel, 1977, 1981) da lugar a las caseínas γ y a las proteasas-peptonas de la leche. Las caseínas γ derivan del dominio hidrofóbico y son extremadamente apolares, extrayéndose con solventes orgánicos (Reimerdes y Herlitz, 1979); por el contrario, la fracción proteasa-peptona que deriva del dominio polar está altamente cargada y es muy estable térmicamente.

Las caseínas sensibles al calcio también sufren proteólisis por proteinasas alcalinas o neutras, produciendo péptidos amargos (Matoba y col., 1970; Minamiura y col., 1972; Shinoda y col., 1985), derivados mayoritariamente de la región C-terminal de la caseína β . Por otra parte, en estudios recientes se han aislado péptidos bioactivos por digestión "in vivo" de las caseínas sensibles al calcio (Loukas y col., 1983; Meisel, 1986; Yoshikawa y col., 1986). Las interacciones de las caseínas con el calcio son necesarias para la formación de las micelas, mientras que los agrupamientos aniónicos de residuos de fosfoserina son los lugares de unión al calcio (Holt y Hukins, 1991). En consecuencia, la solubilidad de las caseínas al calcio dependerá de la concentración de calcio y del número de agrupamientos de estos residuos por molécula, por lo que el orden de solubilidad será $\alpha_{s1} < \alpha_{s2} < \beta < \kappa$ con 3, 2, 1 y 0 agrupamientos, respectivamente (Aoki, 1985; Swaigood, 1982). También se han evaluado los efectos del pH, temperatura y fuerza iónica en la solubilidad de las caseínas determinándose que la solubilidad de las caseínas en presencia de calcio disminuye cuando se incrementan la temperatura y el pH, y se incrementa con la fuerza iónica (Dalglish y Parker, 1980; Farrell y col., 1988).

II.3.3. OBTENCION Y FRACCIONAMIENTO DE LAS CASEINAS

Ya que se han empleado numerosos métodos analíticos para el fraccionamiento de las caseínas, nuestro propósito no es hacer una revisión de todos los métodos existentes, sino realizar una breve descripción de los más utilizados.

Las caseínas totales, que son a menudo el material de partida para el aislamiento de las caseínas individuales, pueden obtenerse por varios procedimientos (McKenzie, 1971), aunque el método más utilizado es la precipitación isoeléctrica, ajustando el pH de la leche desnatada a 4,6 y 20 °C con HCl. La caseína de la leche también puede obtenerse por sedimentación de las micelas, centrifugando a diferentes temperaturas en presencia o ausencia de iones calcio, o por precipitación salina con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ó $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ (Wake y Baldwin, 1961).

II.3.3.1. METODOS DE SOLUBILIDAD DIFERENCIAL

Para obtener una o más de las distintas fracciones caseínicas a partir de las caseínas totales o de la leche desnatada, se han desarrollado un número de métodos basados en su diferente solubilidad (Thompson, 1971; Mackinlay y Wake, 1971). Debido a las fuertes interacciones entre las caseínas, es necesario utilizar un agente disociante, siendo históricamente el más utilizado la urea.

Hipp y col. en 1952, desarrollaron dos procedimientos que, posteriormente, se han utilizado, total o parcialmente, incorporados a otros métodos. El primero, se basa en la diferente solubilidad de las caseínas en etanol al 50% en presencia de acetato amónico y con variaciones en la temperatura, pH y fuerza iónica. El segundo, se basa en la dispersión de las caseínas totales en urea 6,6 M y la separación de las fracciones caseínicas por dilución, ajuste de pH y, finalmente, la adición de sulfato amónico. El orden de precipitación de las caseínas en ambos métodos es α , β y γ caseínas.

La fracción caseínica α_s se puede obtenerse de la caseína total por precipitación con CaCl_2 (Waugh y col., 1962), mientras la caseína κ se obtiene del sobrenadante por precipitación con Na_2SO_4 seguido por reprecipitación al 50% de etanol con acetato amónico (Mckenzie y Wake, 1961). En la precipitación de las caseínas α_{s1} , también se han utilizado el ajuste del pH de una dispersión caseínica en urea (Zittle y Custer, 1963; Fox y Guiney, 1972) y la adición de ácido tricloroacético (Swaigood y Brunner, 1962).

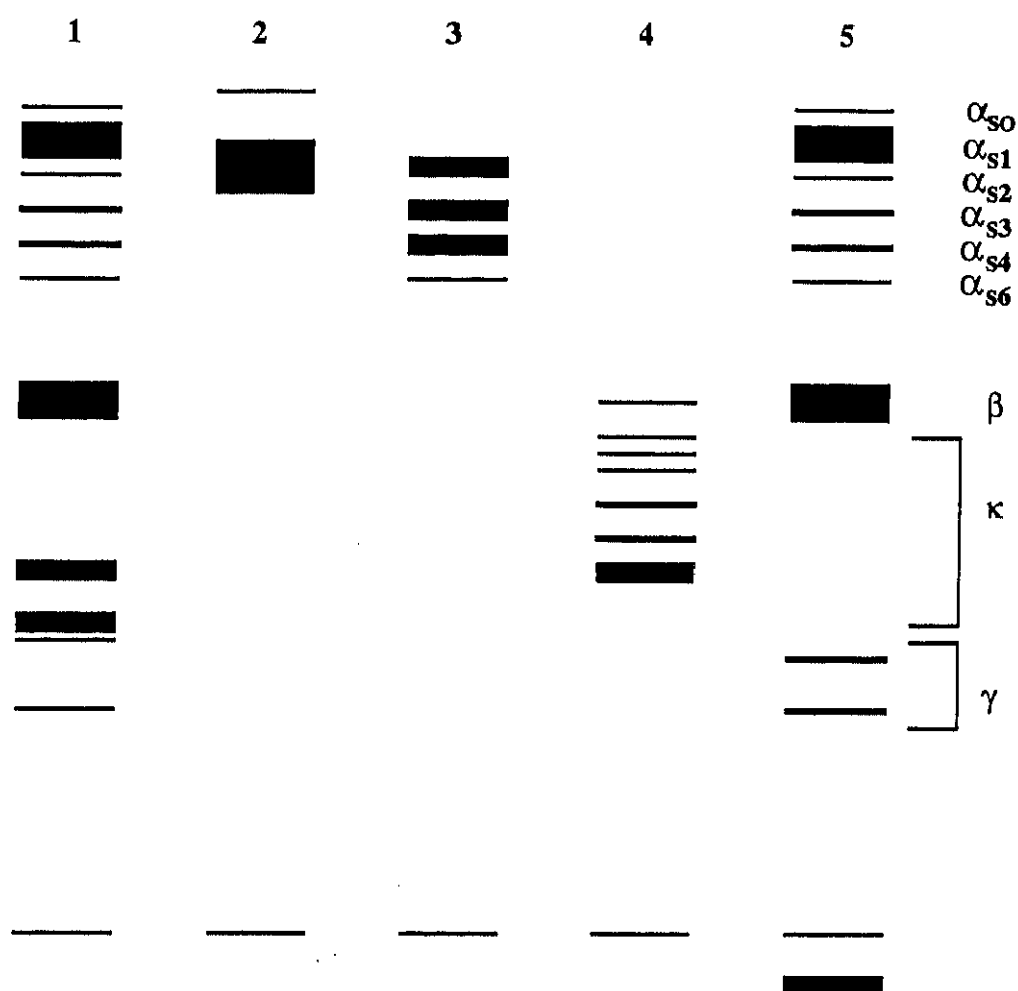


Figura II.4. Separación de las caseínas por electroforesis alcalina en geles de poliacrilamida (Swaisgood, 1982). 1. Caseína total α_{s1} -B, B-A y K-AB; 2. Caseína α_{s1} -BC; 3. Caseína α_{s2} ; 4. κ -A; 5. Caseína total tratada con quimosina

El componente mayoritario de la caseína β se obtiene por una modificación del método de la urea de Hipp y col. (Aschaffenburg, 1963), en el que la caseína total se dispersa en urea y se ajusta a pH 4,6 precipitando el grueso de las caseínas α_s y κ ; el sobrenadante se ajusta a pH 4,9, se diluye en urea 1M y se calienta a 30°C, precipitando la mayor parte de la caseína β .

II.3.3.2. METODOS ELECTROFORETICOS

La identificación y, en muchos casos, la nomenclatura de las proteínas de la leche se basaron originalmente en su movilidad electroforética. Se han desarrollado diversos procedimientos electroforéticos de fraccionamiento y purificación de las caseínas (Thompson, 1971; McKenzie, 1971). El método más utilizado ha sido el de la electroforesis alcalina con urea en geles de poliacrilamida (Eigel y col, 1984 ; Swaisgood, 1975; Andrews, 1981; Swaisgood, 1982), donde los patrones típicos obtenidos para las caseínas totales y varias de las fracciones se muestran en la Figura II.4. y en la que dependiendo de la variante genética de la α_{s1} , ésta, puede o no, resolverse de la α_{s2} . Para la resolución de la caseína κ , lo más eficaz es observar el efecto de la quimosina en la muestra (Kim y col., 1969), ya que este enzima hidroliza específicamente esta proteína. La caseína β y sus variantes genéticas tampoco se separan bien por este método, por lo que sus variantes se descubrieron e identificaron por electroforesis ácida con urea en geles de poliacrilamida (Peterson y Kopfler, 1966).

Las últimas tendencias en los métodos electroforéticos se dirigen hacia la técnica del isoelectroenfoque, por su mayor sensibilidad, precisión y repetibilidad (Trieu-Cuot y Grippon, 1982). Utilizando esta técnica, la separación depende sólo del punto isoelectrónico de la proteína y no de su carga y tamaño. Los puntos isoelectrónicos se extienden en orden creciente de pH 4,9 a 6,5 para las caseínas α_{s1} , β y κ , y de 6,7 a 8,0 para las caseínas γ . Pearce y Zadow (1978) han modificado este procedimiento, utilizando un 5% de poliacrilamida en los geles, urea 6M y un 2% de anfolitos en presencia de mercaptoetanol.

II.3.3.3. METODOS CROMATOGRAFICOS

Como se ha descrito previamente, existen procedimientos químicos de separación de las caseínas por diferencias en su solubilidad, que permiten obtener fracciones enriquecidas respecto a las caseínas individuales, pero solamente las técnicas cromatográficas proporcionan fracciones homogéneas. La cromatografía de filtración en gel, cuya

separación se basa en el tamaño de las moléculas, resulta insatisfactoria debido a que los pesos moleculares de las caseínas son similares. Haasnot y col. (1987) emplearon dos columnas de filtración en serie con un tampón $0,1 \text{ M Na}_2\text{SO}_4 + 0,02 \text{ M H}_2\text{PO}_4$, pH 6,8 y urea 6 M, obteniendo dos picos de absorbancia a 280 nm, el primero de ellos conteniendo las caseínas α_{S1} , β y γ , y, el segundo, con otros componentes no bien definidos.

Recientemente, las técnicas de cromatografía de intercambio iónico se han utilizado con éxito en la identificación, aislamiento y cuantificación de las caseínas individuales, permitiendo la separación de moléculas que presentando tamaños similares, difieren ligeramente en su punto isoelectrico. La naturaleza anfótera de las moléculas de caseína hace posible su adsorción tanto a intercambiadores aniónicos como catiónicos. La elución se consigue modificando el pH, la fuerza iónica o ambos, empleando un gradiente lineal o discontinuo.

Debido a la tendencia de las caseínas a agregarse, deben utilizarse agentes disociantes como la urea y reductores (debido a la existencia de puentes disulfuro en la caseína κ) como el mercaptoetanol. Si bien la elución se consigue normalmente incrementando la concentración de cloruro o de fosfato, Yaguchi y Rose (1971) describieron cuatro tipos de elución que han facilitado el éxito de esta técnica: soluciones tampón no disociativas y no reductoras, soluciones tampón con urea sin agentes reductores, soluciones tampón con urea y 2-mercaptoetanol y soluciones tampón con dimetilformamida.

II.3.3.3.1. Técnicas cromatográficas clásicas

Algunas separaciones se han realizado con soluciones tampón sin agentes disociantes ni reductores. No obstante, debido a que la asociación de las caseínas es dependiente de la temperatura, Tarrasuck y col. (1965), determinaron el efecto de la temperatura en la cromatografía de intercambio aniónico de las caseínas en columnas de Dietilaminoetil (DEAE)-celulosa. Como se esperaba, las caseínas eluyeron a menores concentraciones de NaCl a 4°C que a 25°C . También se han utilizado columnas de Trietilaminoetil (TEAE)-celulosa y DEAE-Sephadex (Igarashi y Saito, 1970; Gordon y col., 1972). Groves y col. (1962) y Groves y Gordon (1969), consiguieron en una columna de DEAE-celulosa y empleando como eluyente una solución tampón no disociativa y no reductora, el aislamiento de las caseínas γ_1 , γ_2 y β , de la caseína entera a pH 8,3.

La cromatografía de intercambio aniónico con urea como agente disociante pero sin

agentes reductores, se ha utilizado también por numerosos investigadores en el fraccionamiento o purificación de las caseínas. Ribadeau-Dumas y col. (1964) cromatografiaron caseína entera en DEAE-celulosa con urea a pH 7 y un gradiente de ClNa de 0 a 0,6 M, obteniendo caseínas α_s y β de forma moderadamente puras, pero con la caseína κ como principal contaminante. El mismo procedimiento se ha utilizado para la separación de las diferentes variantes de la caseína α_{s1} (Thompson y Kiddy, 1964) y en la caracterización de las caseínas β (Tripathi y Gehrke, 1969) y las caseínas κ (Tripathi y Gehrke 1970; Gordon y col., 1972).

Otra técnica utilizada para facilitar el fraccionamiento cromatográfico de las fracciones caseínicas, comprende la reducción y alquilación posterior de las caseínas antes de su cromatografía. Además de la fuerte asociación de las caseínas β y κ , lo que dificulta su separación durante el fraccionamiento cromatográfico (Swaigood y Brunner, 1962), el aislamiento de las diferentes caseínas κ constituye un problema especial debido a la incorporación de cantidades variables de residuos de ácido siálico. La alquilación bloquea los grupos sulfhidrilo, lo que con propósitos cromatográficos resulta similar a la reducción de los grupos disulfuro.

Rose y col. (1969) redujeron la caseína bruta con mercaptoetanol, alquilaron el producto con iodoacetamida en una columna de DEAE-celulosa y eluyendo las caseína con un gradiente continuo de NaCl en un tampón tris-citrato-urea, consiguieron separar y cuantificar las fracciones caseínicas α_s , β y κ . Davies y Law (1977) modificaron este procedimiento utilizando Wathman DE11, un intercambiador de mayor capacidad de unión a proteínas y mejores propiedades cinéticas y eluyendo las caseínas con un gradiente lineal de ClNa en un tampón tris-HCl-urea, obtuvieron una estimación cuantitativa de las principales caseínas fraccionadas.

Otra alternativa utilizada en el fraccionamiento de las caseínas, es el uso de soluciones tampón con urea y mercaptoetanol (Hoagland y col., 1971; Yaguchi y Rose, 1971; El-Negoumy, 1976). Thompson (1966) añadió mercaptoetanol al eluyente, observando que en una columna de DEAE-celulosa, la caseína κ reducida se separaba de las caseínas α_s y β a fuerzas iónicas bajas (0,005 M NaCl). Mercier y col. (1968) y El-Negoumy (1976) emplearon este mismo método variando los eluyentes, obteniendo un fraccionamiento similar de las diferentes fracciones caseínicas. Creamer (1974), utilizó este método para separar la $\alpha_{s1}A$ de la caseína total que contenía las variantes A y B. La variante B se degradó con pepsina y la A se aisló de los productos de degradación, por cromatografía en columna con DEAE-celulosa con un gradiente de ClNa de 0 a 0,5 M en un

tampón de 4,5 M urea y pH 5,5, conteniendo un 0,1% de mercaptoetanol. La sustitución de la urea por la dimetilformamida también se ha utilizado por diversos autores (Yaguchi y Rose, 1971; Mackinlay y Wake, 1965) pero presenta el inconveniente de que libera vapores muy tóxicos.

En los procedimientos descritos anteriormente, se emplearon gradientes salinos a pH constante durante la elución de las fracciones caseínicas, mientras Vreeman y col. (1977) demostraron una mejor separación de la caseína κ en columnas de DEAE-celulosa con un gradiente de pH en el tampón de elución. Otro método utilizado ha consistido en la utilización de columnas cromatográficas en serie. Wei y Whitney (1985) utilizaron un procedimiento en serie para separar la caseína entera en 5 fracciones (caseínas γ , κ , β , α_{s2} y α_{s1}), facilitando la obtención de cantidades del orden de gramos de las principales fracciones individuales.

La cromatografía de intercambio catiónico también se ha utilizado en la separación de las diferentes fracciones caseínicas. Annan y Manson (1969) utilizando columnas de Sulfoetil-Sephadex con un tampón formato, fraccionaron el complejo α_s , utilizándose también columnas con otras mareas como las de carboxy-metil-celulosa (CMC) y carragenato potásico (Kim y col., 1969, Kopfler y col., 1969; Snoeren y col., 1977).

II.3.3.3.2. Fraccionamiento por técnicas cromatográficas de alta resolución

Aunque los métodos de separación descritos anteriormente poseen exactitud y precisión, resultan lentos y requieren disponer de gran cantidad de muestra. Para solucionar este problema se ha recurrido a la utilización de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando columnas de intercambio iónico. Estos procedimientos permiten separar las caseínas en pocos minutos, mediante el empleo de grandes presiones y requieren la aplicación de muy poca cantidad de muestra, obteniendo resultados comparables a la electroforesis en cuanto a la resolución de los componentes individuales, con la ventaja de permitir su recuperación para su caracterización ulterior.

Entre los soportes cromatográficos empleados destacan las columnas de TSK-gel DEAE-5PW (Humphrey y Newsome, 1984; Visser y col., 1986), resistentes en un amplio intervalo operativo (pH 2-12) ; columnas Mono Q FPLC de cromatografía de intercambio

aniónico (Barrefords y col., 1985; Andrews y col., 1985; Dalglish, 1985; Davies y Law, 1987 y Guillou y col., 1987) y columnas de cromatografía de intercambio catiónico Mono S FPLC (Hollar y col., 1991). En la Tabla II.5., se resumen los métodos más utilizados en el fraccionamiento de las caseínas, utilizando técnicas cromatográficas de HPLC y FPLC.

Humphrey y Newsome (1984), utilizando columnas de intercambio aniónico TSH-DEAE-5PW y Mono Q HR 5/5, consiguieron mejores resultados que los obtenidos en DEAE-celulosa (Mercier y col., 1968) y en un período de tiempo menor (1 hora para TSK y 25 minutos para Mono Q, comparados con las 20 horas para la DEAE). La elución se realizó con un gradiente lineal de ClNa y las muestras de caseína se disolvieron en el tampón inicial, después de adicionar ditiotreitol o mercaptoetanol, para permitir su disociación y prevenir la agregación caseínica. Utilizando estas condiciones Andrews y col. (1985) y Guillou y col. (1987), separaron además de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β , 5 ó 6 componentes de la caseína κ . Además, utilizando la columna Mono Q HR 5/5, Guillou y col. (1987) separaron la variante C de la caseína β de las otras variantes (A1, A2 y B) y las variantes A y B de la caseína κ , siendo el método empleado reproducible en la cuantificación de las caseínas de la leche de vaca.

También es satisfactoria la separación de las caseínas por cromatografía de intercambio iónico en fase reversa (Barrefords y col., 1985; Visser y col., 1986 y Mikkelsen y col., 1987), siendo posible con este método una mejor resolución de las caseínas α_{s1} y α_{s2} que con la columna Mono Q (Visser y col., 1986), lo que también sucede cuando se utilizan columnas de interacción hidrofóbica (Chaplin, 1986).

Actualmente, el desarrollo de nuevos intercambiadores ha hecho posible realizar separaciones cada vez más rápidas, al mismo tiempo que permiten el tratamiento de una gran cantidad de muestra. Ng-Kwai-Hang y Pelissier (1989) utilizando cartuchos de QAE ZetaPrep 250 consiguieron una excelente recuperación de las fracciones, aunque no resultaron muy eficaces en la separación de las caseínas α_{s1} y α_{s2} entre sí. La creciente introducción de fases estacionarias y eluyente que posibilitan separaciones cada vez más rápidas, proporcionando fracciones bien resueltas y puras respecto de las caseínas individuales, hacen de la cromatografía de intercambio iónico el procedimiento idóneo de aislamiento y purificación de las diferentes fracciones caseínicas, lo que posibilitará un conocimiento cada vez más amplio de sus propiedades físico-químicas.

Tabla II.5. Fraccionamiento de las Caseínas por Técnicas Cromatográficas de Alta Resolución

FASE ESTACIONARIA	TAMPON	DETECCION	OBJETIVO	CROMATOGRAFIA	REFERENCIAS
TSK-DEAE-5PW Mono Q HR 5/5	a) 0,02 M Tris-HCl 4,5 M Urea, pH 8 b) idem a) + 0,5 M NaCl	280 nm	Fraccionamiento de proteínas lácteas	Intercambio aniónico	Humphrey y Newsome, 1984
Mono S HR 5/5	0,05 M Formato sódico pH 3,8, 8 M Urea 0,01 M 2-Mercaptoetanol Gradiente (0-0,5 M NaCl)	280 nm	Separación de proteínas de la leche (caseínas)	Intercambio catiónico	Andrews y col., 1985
Mono Q HR 5/5	0,02 M Tris-ClH, pH 7,0 4,5 M Urea 0,01 M 2-Mercaptoetanol Gradiente (0-0,5 M NaCl)	280 nm	Separación de proteínas de la leche (caseínas)	Intercambio aniónico	
Mono Q HR 5/5	3,3 M urea, 0,01 M Imidazol pH 7,0 Gradiente (0-0,3 M NaCl)	280 nm	Análisis de diferentes formas de la caseína κ	Intercambio aniónico	Dalgleish, 1985
C 8 HR 5/10	a) 0,1% TFA en 30% CH ₃ CN b) 0,1%TFA en 48% CH ₃ CN	280 nm	Separación de caseínas	Fase reversa	Barrefords y col., 1985

Tabla II.5. : Continuación

FASE ESTACIONARIA	TAMPON	DETECCION	OBJETIVO	CROMATOGRAFIA	REFERENCIAS
Mono Q HR 5/5	0,01M Imidazol-ClH pH 7,0 3,3 M Urea 0,01 M 2-Mercaptoetanol Gradiente (0-0,5 M NaCl)	280 nm	Separación de caseínas	Intercambio aniónico	
Bio-Gel HP HT	a) 0,005 M KH ₂ PO ₄ 6 M Urea, 600 µM Cl ₂ Ca pH 6,8 b) 0,4 M KH ₂ PO ₄ 6 M Urea, 7 µM Cl ₂ Ca pH 6,8	280 nm	Separación de proteínas de la leche (caseínas)	Mecanismo mixto	Visser y col., 1986
Bio-Gel TSK-DEAE 5 PW	0,005 M Tris-HCl pH 8,2 4 M Urea, 0,03 M NaCl Gradiente (0,028-0,28 M NaCl)			Intercambio aniónico	
Hi-Pore RP-318	a) 0,1% TFA en 10% CH ₃ CN a) 0,1% TFA en 90% CH ₃ CN			Fase Reversa	
Bio-gel TSK Fenil RP	a) 0,1% TFA en 10% CH ₃ CN a) 0,1% TFA en 90% CH ₃ CN			Fase Reversa	
Fenil-Superosa HR 5/5	a) 0,8 M Fosfato sódico 3,7 M Urea, pH 6 b) 0,05 M Fosfato sódico, 3,75 M Urea pH 6,0	280 nm	Estudio interacciones hidrofóbicas	Interacción Hidrofóbica	Chaplin, 1986

Tabla II.5. : Continuación

FASE ESTACIONARIA	TAMPON	DETECCION	OBJETIVO	CROMATOGRAFIA	REFERENCIAS
Lichrosob RP-8	a) 0,1% TFA en agua 0,01 M DTT b) 0,1% TFA en propanodiol	254 nm	Purificación de caseínas e identificación de la caseína α_{s1}	Fase Reversa	Mikkelsen, 1987
Mono Q HR 5/5	0,05 M Bis-Tris propano pH 7,3, Urea 3M Gradiente (0-0,43 M NaCl)	280 nm	Fraccionamiento cuantitativo de mezclas caseínicas	Intercambio aniónico	Davies y Law, 1987
Mono Q HR 5/5	0,05 M Tris-HCl, pH 8,0 4,5 M Urea 6,4 x 10 M DTT Gradiente (0,12-0,32 M NaCl)	280 nm	Análisis cuantitativo de caseínas	Intercambio aniónico	Guillou, 1987
Mono S HR 5/5	0,02 M Acetato, 6 M Urea, pH 5,0 Gradiente (0-0,3 M NaCl)	280 nm	Análisis cuantitativo de caseínas	Intercambio catiónico	Hollar y col., 1991

Fuente: González-LLano, 1992

II.4. TIPOS DE CASEINAS

El grupo de proteínas lácteas denominado caseínas, consta de cuatro tipos de polipéptidos : α_{S1} , α_{S2} , β y κ , además de algunos derivados procedentes de la proteólisis de estas cadenas.

II.4.1. CASEINA α_{S1}

Esta caseína, junto con las caseínas α_{S2} y la β , forman el grupo de caseínas sensibles al calcio. La caseína α_{S1} es el componente mayoritario en la leche de vaca, mientras la variante B de esta caseína ha sido la primera cuya estructura primaria se ha establecido (Mercier y col., 1971, Grosclaude y col., 1973). Dicha estructura (Figura II.5.), consta de 199 aminoácidos con un peso molecular de 23.614 daltons y se encuentra formada por dos regiones predominantemente hidrofóbicas (restos 1-44 y 90-199) y una zona polar muy cargada (45-89). Es relativamente rica en fósforo, 8 átomos por molécula, situándose todos menos uno en el segmento 45-89 y posee un gran número de residuos de prolina (8,5%), los cuales se encuentran uniformemente distribuidos a intervalos en los segmentos hidrofóbicos, por lo que esta proteína puede considerarse como una cadena polipeptídica laxa y flexible. Estas circunstancias permiten la existencia de un número de grupos no polares, termodinámicamente inestables, expuestos en la superficie, lo que debido a las uniones hidrofóbicas provoca la asociación o formación de polímeros (Creamer y col., 1982; Dosaka y col., 1980; Kato y Nakai, 1980). Creamer y col. (1981) y Herskovits (1966) han determinado que la molécula de caseína α_{S1} tiene aproximadamente un 70% de estructura desordenada, con una pequeña estructura secundaria en forma de α hélice o estructura β . Esta caseína es sensible al calcio al pH normal de la leche, pudiéndose producir su precipitación a cualquier temperatura, de ahí la utilización del subíndice s.

En la actualidad se conocen 5 variantes genéticas de la caseína α_{S1} bovina: A, B y C detectadas por Thompson y col. (1962) y la variante D detectada por Grosclaude y col. (1966), siendo las variantes B y C las más extendidas; la mutación responsable de la variante F no se conoce todavía. El polimorfismo parece ser específico de raza, con la variante B predominando en Bos taurus y la C en Bos indicus y Bos grunniens (Thompson 1971, Grosclaude y col., 1974). En la Figura II.6., se muestra el polimorfismo genético de las 6 lactoproteínas mayoritarias bovinas, observándose que en la α_{S1} las variantes C y D no difieren de la B más que por la sustitución de un residuo aminoacídico aminado

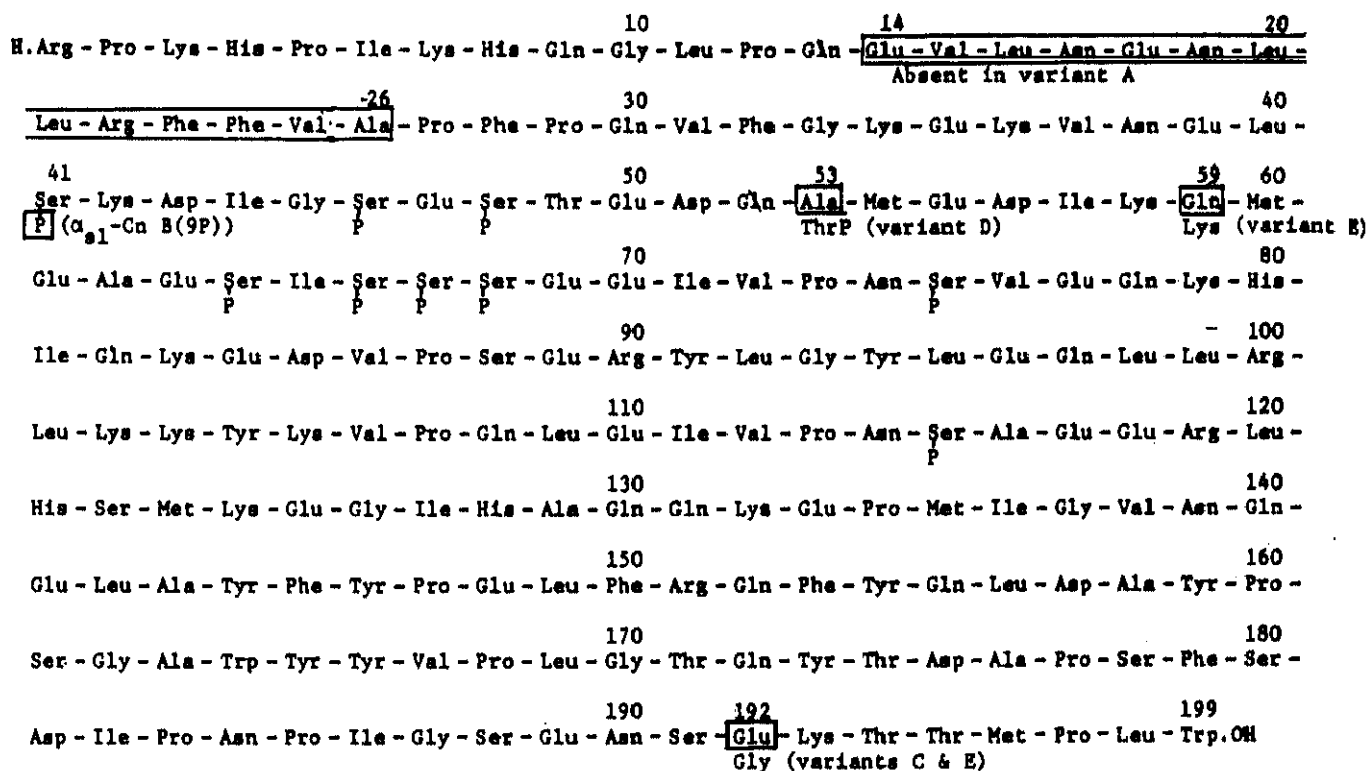


Figura II.5. Estructura primaria de la caseína α_{s1} B-8P bovina
(Withney, 1988)

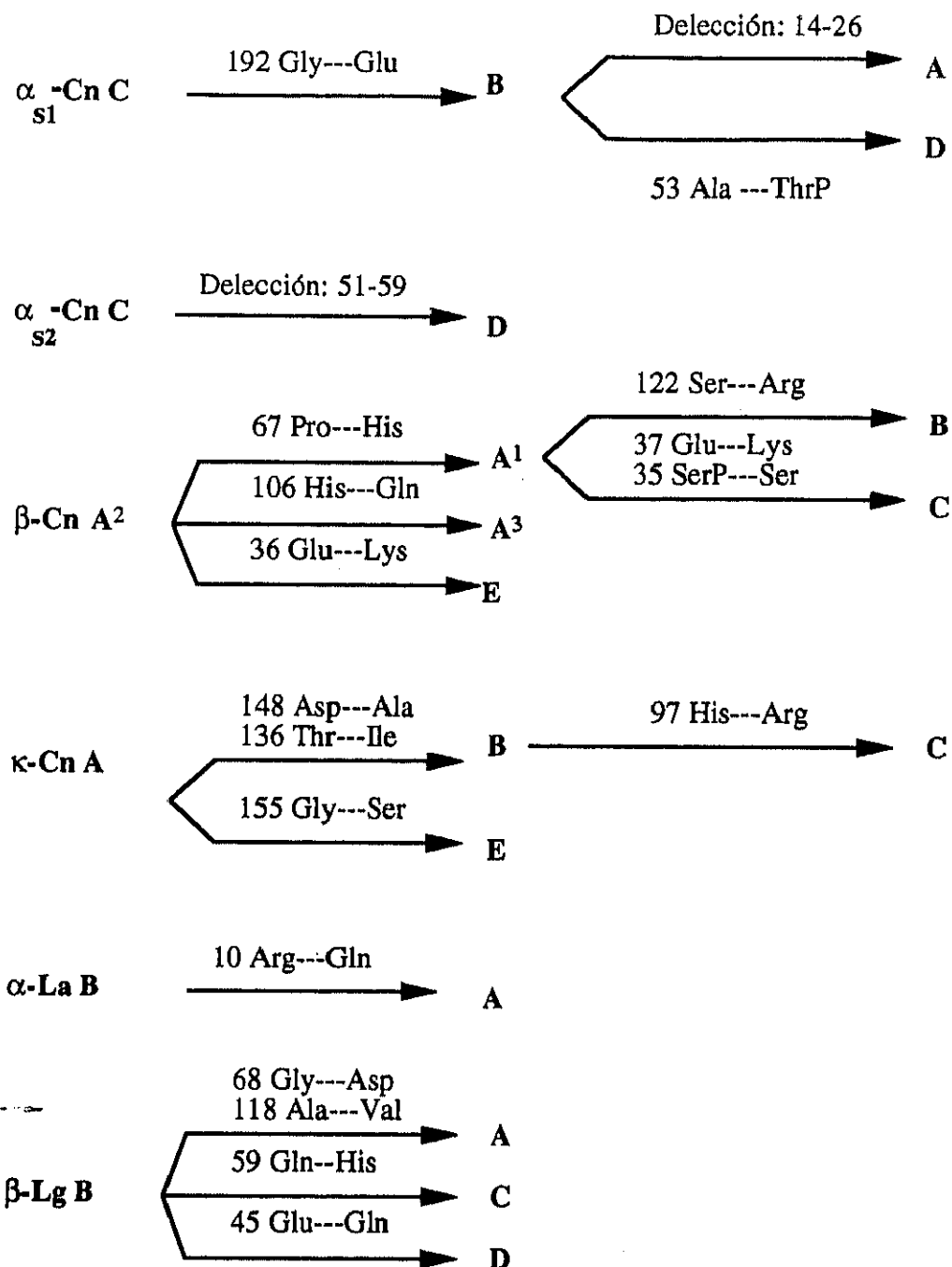


Figura II.6. Polimorfismo genético de las 6 lactoproteínas bovinas (Martín, 1993)

afectando respectivamente a las posiciones 192 Glu---Gly) y 53 Ala---ThrP (Grosclaude y col., 1969; 1972) mientras la variante A se caracteriza por una delección en un segmento de 13 aminoácidos (residuos 14 a 26, Grosclaude y col., 1970).

En la leche existe una pequeña cantidad de péptidos, llamados caseína λ (El Negoumy, 1973), con mapas peptídicos y pesos moleculares idénticos a los producidos por la plasmina de la leche fresca sobre la caseína α_{s1} (Aimutis y Eigel, 1982), por lo que dichos péptidos parecen ser fragmentos de la caseína α_{s1} , los cuales se encuentran en la leche como resultado de la proteólisis de la caseína α_{s1} por la plasmina.

II.4.2. CASEINA α_{s2}

Esta familia de caseínas posee 5 componentes con movilidades electroforéticas entre las de las caseínas α_{s1} y β y en la leche de vaca se designaron inicialmente como α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s5} y α_{s6} o caseínas minoritarias según su movilidad decreciente (Annan y Manson, 1969, Whithney y col., 1976), aunque trabajos posteriores indicaron que todas ellas tienen la misma secuencia aminoacídica con diferentes grados de fosforilación post-traducciona (Brignon y col., 1976; 1977). Debido a estas modificaciones post-traduccionales, Eigel y col. (1984) las nombraron como sigue : α_{s2} (α_{s2} - X 13P), α_{s3} (α_{s2} - X 12P), α_{s4} (α_{s2} - X 11P), y α_{s6} (α_{s2} - X 10P), aunque por su composición aminoacídica y el efecto del mercaptoetanol sobre sus propiedades electroforéticas, la α_{s5} ha sido identificada como un dímero de los componentes 11P y 12P, enlazados por un puente disulfuro (Hoagland y col., 1971).

La estructura primaria de la caseína α_{s2} A-11P (Figura II.7.), consta de una cadena polipeptídica de 207 residuos aminoacídicos con un peso molecular de 25.230 daltons (Brignon y col., 1977), conteniendo 2 residuos de cisteína y 10, 11, 12 y 13 grupos fosfato. Es la más hidrofílica de todas las caseínas y tiene una estructura dipolar manifiesta con las cargas negativas cerca del N-terminal y las positivas cerca del C-terminal. Una pequeña proporción de esta caseína aparece como un dímero unido por puentes disulfuro. Sus propiedades no se han investigado con la misma profundidad que las de otras caseínas, pero sin duda liga fuertemente el calcio y es más sensible a la precipitación por calcio que la α_{s1} . A pH neutro y en ausencia de calcio se autoasocia, dependiendo la asociación de la fuerza iónica; dicha asociación, como la de la caseína α_{s1} , se equilibra rápidamente y a medida que aumenta su concentración origina polímeros de tamaño creciente.

H, Lys - Asn - Thr - Met - Glu - His - Val - Ser - Ser - Ser - Glu - Glu - Ser - Ile - Ile - Ser - Gln - Glu - Thr - Tyr - 20
P P P
Lys - Gln - Glu - Lys - Asn - Met - Ala - Ile - Asn - Pro - Ser - Lys - Glu - Asn - Leu - Cys - Ser - Thr - Phe - Cys - 40
Lys - Glu - Val - Val - Arg - Asn - Ala - Asn - Glu - Glu - Glu - Tyr - Ser - Ile - Gly - Ser - Ser - Ser - Glu - Glu - 60
50 51 52 (absent in variant D) P P P 58 59 60
Ser - Ala - Glu - Val - Ala - Thr - Glu - Glu - Val - Lys - Ile - Thr - Val - Asp - Asp - Lys - His - Tyr - Gln - Lys - 80
P
Ala - Leu - Asn - Glu - Ile - Asn - Glu - Phe - Tyr - Gln - Lys - Phe - Pro - Gln - Tyr - Leu - Gln - Tyr - Leu - Tyr - 100
Gln - Gly - Pro - Ile - Val - Leu - Asn - Pro - Trp - Asp - Gln - Val - Lys - Arg - Asn - Ala - Val - Pro - Ile - Thr - 120
Pro - Thr - Leu - Asn - Arg - Glu - Gln - Leu - Ser - Thr - Ser - Glu - Glu - Asn - Ser - Lys - Lys - Thr - Val - Asp - 140
P P
Met - Glu - Ser - Thr - Glu - Val - Phe - Thr - Lys - Lys - Thr - Lys - Leu - Thr - Glu - Glu - Glu - Lys - Asn - Arg - 160
P
Leu - Asn - Phe - Leu - Lys - Lys - Ile - Ser - Gln - Arg - Tyr - Gln - Lys - Phe - Ala - Leu - Pro - Gln - Tyr - Leu - 180
Lys - Thr - Val - Tyr - Gln - His - Gln - Lys - Ala - Met - Lys - Pro - Trp - Ile - Gln - Pro - Lys - Thr - Lys - Val - 200
Ile - Pro - Tyr - Val - Arg - Tyr - Leu - OH

Figura 11.7. Estructura primaria de la caseína α_{s2} A-11P bovina
(Withney, 1988)

La caseína α_{s2} parece menos polimorfa que la α_{s1} y en los bóvidos sólo se han detectado 2 variantes, la A y la D. Las movilidades electroforéticas de algunas variantes D son menores que las bandas correspondientes en la variante A a pH 8,6 (Grosclaude y col., 1978; 1979). Las variantes A y D se han observado en razas europeas (Bos taurus) y se diferencian por una delección interna de un segmento de 9 residuos aminoacídicos conteniendo uno de los 2 sitios de fosforilación múltiple de esta caseína.

II.4.3. CASEINA β

La secuencia aminoacídica completa de la caseína β A² (Figura II.8.) indica una cadena polipeptídica de 209 residuos aminoacídicos con un peso molecular calculado de 23,983 (Ribadeau-Dumas y col., 1972, Grosclaude y col., 1973) con 5 fosfoserinas (excepto en una variante) y ninguna cisteína. Además, dicha caseína posee dominios hidrofóbicos e hidrofílicos claramente separados y es la caseína más hidrofóbica con una zona N-terminal cargada negativamente y el resto de la cadena, sin carga neta, rica en residuos hidrofóbicos. Esta caseína consta de un componente mayoritario, con al menos siete variantes génicas y 8 componentes minoritarios, los cuales, son fragmentos proteolíticos del componente mayoritario.

En electroforesis alcalina con urea, las variantes A¹, A², A³ migran con la misma movilidad pero más rápidamente que las otras variantes, que lo hacen en el orden siguiente: B > D, E > C (Thompson 1970, Voglino, 1972). Para diferenciar las variantes A, sus movilidades deben determinarse en electroforesis ácida con urea (Thompson 1970; Kiddy, 1975), en el que las variantes génicas se mueven en el siguiente orden: C > B = D > A¹ = E > A² > A³. Las variantes A son los polimorfos predominantes en todas las especies, así como en las especies del género Bos investigados (Thompson, 1971). Las variantes A¹, B y C se diferencian de las otras dos (A² y A³), por una sustitución His---Pro en posición 67, mientras la variante B se caracteriza por una sustitución Glu---Lys en posición 37, lo que conlleva la no fosforilación del residuo Serina 35. La variante A³ se caracteriza por una sustitución His---Gln, en posición 106, mientras las 2 variantes más repartidas en los bovinos, son la A¹ y A².

La acción de las proteinasas sobre la caseína β es muy interesante: se sabe desde hace algún tiempo que un grupo de caseínas denominadas caseínas γ , corresponden a porciones C-terminales de la secuencia caseínica β , procedentes de la acción de la plasmina sobre la caseína β en las posiciones 28/29, 105/106 y 107/108. Los fragmentos más pequeños

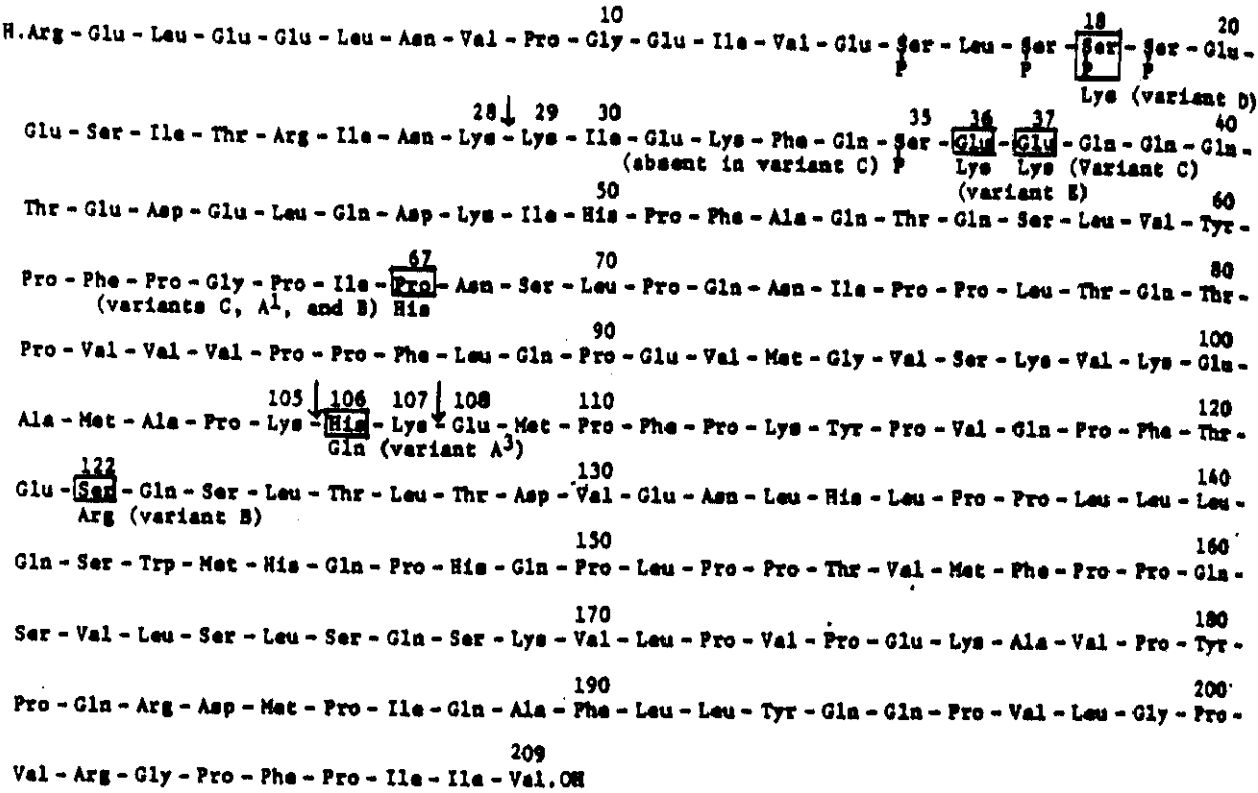


Figura 11.8. Estructura primaria de la caseína β A²-5P bovina
(Withney, 1988)

resultantes de la escisión aparecen en el suero al precipitar la caseína por un ácido y forman parte de lo que se ha llamado desde hace mucho tiempo fracción proteasa-peptona del suero. Los fragmentos 1-10 y 1-107 se llamaron componentes 5 del suero, el fragmento 1-28 componente 8 rápido y los 29-105 y 20-107 componente 8-lento del suero.

II.4.4. CASEINA K

Esta caseína por su composición y las propiedades que de ella emanan, es uno de los componentes más interesantes de la caseína bruta. La familia de la caseína κ tal y como se aísla en la leche, comprende una mezcla de polímeros unidos por enlaces disulfuro, siendo la única glicoproteína del grupo. La forma nativa puede reducirse a un monómero formado por una cadena polipeptídica de 169 residuos aminoacídicos (Figura II.9.), con dos residuos de cisteína en las posiciones 11 y 88 y uno de fosfoserina en la posición 149 (y algunas veces en 127) y diversos grados de glicosilación. Su peso molecular es de 19,007 daltons.

La caseína κ es pobre en fósforo (0,2%), lo que representa de 1 a 2 átomos de fósforo por molécula. Por el contrario, su contenido en serina y treonina es elevado y es notable la presencia de cisteína. Esta caseína como se ha mencionado, es la única que contiene una fracción glucósido, formada por una o varias secuencias de acetilgalactosamina-galactosa-ácido-N- acetilneuramínico o siálico. Las secuencias glicosídicas comienzan con la unión de la galactosa al grupo hidroxilo de la treonina, siendo común la prolongación de la cadena glicosídica por la unión de otros azúcares a la galactosa. Su extremo C-terminal es fuertemente aniónico, resultando en una molécula muy anfipática.

La caseína κ , que impide la precipitación de las otras caseínas en presencia de calcio, juega un papel determinante en el mantenimiento de la estructura de las micelas. La hidrólisis del enlace Phe 105-Met 106 (MacDonald y Thomas, 1970; Polzhofer, 1972) por la quimosina, escinde la molécula en dos segmentos peptídicos, la para- κ -caseína (1-105), fragmento N-terminal contiene todos los grupos fosfato y carbohidratos además de las sustituciones génicas, con una parte central rica en aminoácidos aromáticos (fuertemente hidrófoba) y el caseinomacropéptido (fracción 106-169 o 106-171 en el caso de la cabra), rica en aminoácidos alcohólicos e hidrófila y soluble. La reacción descrita constituye la base de la coagulación de la leche por la renina, y por lo tanto, de la fabricación del queso. La coagulación de la leche por el cuajo o enzimas de origen fúngico depende de numerosos factores (reenfriamiento, contenido en iones calcio, riqueza en caseínas, etc.) y de la tecnología utilizada.

PyroGlu - Glu - Gln - Asn - Gln - Glu - Gln - Pro - Ile - Arg - Cys - Glu - Lys - Asp - Glu - Arg - Phe - Phe - Ser - Asp -	10	20
Lys - Ile - Ala - Lys - Tyr - Ile - Pro - Ile - Gln - Tyr - Val - Leu - Ser - Arg - Tyr - Pro - Ser - Tyr - Gly - Leu -	30	40
Asn - Tyr - Tyr - Gln - Gln - Lys - Pro - Val - Ala - Leu - Ile - Asn - Asn - Gln - Phe - Leu - Pro - Tyr - Pro - Tyr -	50	60
Tyr - Ala - Lys - Pro - Ala - Ala - Val - Arg - Ser - Pro - Ala - Gln - Ile - Leu - Gln - Trp - Gln - Val - Leu - Ser -	70	80
Asp - Thr - Val - Pro - Ala - Lys - Ser - Cys - Gln - Ala - Gln - Pro - Thr - Thr - Met - Ala - Arg - His - Pro - His -	90	100
Pro - His - Leu - Ser - Phe - Met - Ala - Ile - Pro - Pro - Lys - Lys - Asn - Gln - Asp - Lys - Thr - Glu - Ile - Pro -	105 106	110
Thr - Ile - Asn - Thr - Ile - Ala - Ser - Gly - Glu - Pro - Thr - Ser - Thr - Pro - Thr - <u>Ile</u> - Glu - Ala - Val - Glu -	130	136
Ser - Thr - Val - Ala - Thr - Leu - Glu - <u>Ala</u> - Ser - Pro - Glu - Val - Ile - Glu - Ser - Pro - Pro - Glu - Ile - Asn -	148	150
(variant A) Asp - P	160	
Thr - Val - Gln - Val - Thr - Ser - Thr - Ala - Val - OH	169	

Figura II.9. Estructura primaria de la caseína κ B-1P bovina (Withney, 1988)

De la caseína κ bovina se conocen 4 variantes genéticas de las que las más repartidas son la A y la B (Thompson, 1970, Mackinlay y Wake, 1971), siendo la variante A la predominante en la mayoría de las razas (Aschaffenburg, 1968). Las variantes A y B se diferencian por 2 sustituciones Asp---Ala en posición 148 y Thr---Ile en posición 136, con la última mutación afectando a un sitio de glicosilación.

La introducción de técnicas electroforéticas más resolutivas como la del isoelectroenfoque (IEF), ha permitido la detección de 2 nuevas variantes: la C (Di Stasio y Merlin, 1979) y la E (Erhardt, 1989), cuya caracterización bioquímica es reciente (Miranda y col., 1993), las cuales difieren, respectivamente, de las variantes B y A por una sustitución His---Arg en posición 97 y otra Gly---Ser en posición 155.

II.5. DIFERENCIAS EN LA COMPOSICION CASEINICA DE LAS LECHES DE VACA, OVEJA Y CABRA

Según las especies, la composición de la leche difiere cualitativa y cuantitativamente, según la especie animal considerada. Se ha determinado que un litro de leche de vaca contiene como término medio 32 g/l de proteína, que se descomponen en 26 g de caseínas (80%) y 6 g de proteínas solubles (20%), mientras el contenido total, así como las proporciones relativas de cada caseína son características de la especie. Así, en la leche de oveja las caseínas representan el 83% y en la de cabra el 77 % de la proteína total. Las caseínas α_{S1} , α_{S2} , β y κ se encuentran en la leche de vaca en las proporciones 4:1:4:1, respectivamente, mientras que las leches de oveja (2:2:5:1) y cabra (1:2:5:2) se consideran leches ricas en caseína β (Assenat, 1985; Remeuf y Lenoir, 1986). La composición de la fracción caseínica influye en las características estructurales y las propiedades de las micelas y es responsable de variaciones en sus propiedades tecnológicas (Remeuf y col., 1989).

La información disponible sobre las proteínas de las leches de oveja y cabra es más limitada (Ramos y Juárez, 1981; Anifantakis, 1986; Jeness 1980; 1982; Amigo, 1989a), aunque el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha permitido dilucidar las estructuras primarias de las proteínas de la leche de la mayoría de las especies (Bonsing y Mackinlay, 1987). Los estudios realizados con las caseínas de la leche de vaca, oveja y cabra (Assenat, 1985; Ono y col., 1989) indican diferencias significativas en la distribución de las diferentes caseínas de la leche, así como en su migración electroforética, composición aminoacídica, composición de minerales, número de residuos, su comportamiento ante la proteólisis y en el número de variantes genéticas. En un estudio comparativo efectuado entre

las leches de vaca, oveja y cabra (Assenat, 1991), se ha determinado que: 1) El porcentaje de caseínas α_{s1} y α_{s2} es más elevado en la leche de oveja que en la de cabra: 30,2% frente al 12,6%, pero más bajo que en la leche de vaca, en la que representa el 45,5%, 2) en la leche de oveja, las caseínas β constituyen cerca del 50% de las caseínas, mientras en la leche de cabra constituyen los 2/3 del porcentaje total y 1/3 en la leche de vaca.

Las diferencias observadas en la composición de la fracción caseínica permiten explicar (Richardson y Creamer, 1974), el que la composición de las micelas en las tres especies sea similar, aunque existen diferencias en el tamaño y distribución de las submicelas. Las caseínas de la leche de cabra contienen un porcentaje menor de ácido glutámico que la de vaca, que, por el contrario, posee más histidina, mientras la mayor concentración de minerales y la menor hidratación de la micela de la leche de cabra, le confieren una débil estabilidad térmica. Asimismo, el contenido de calcio y fósforo de las micelas de las tres especies son similares y aunque la leche de oveja tiene un contenido en calcio algo mayor que la leche de vaca, los contenidos de calcio y fósforo de las leches de cabra y vaca, son parecidos (Irlam y col., 1985).

También conviene conocer que la leche de oveja es especialmente rica en componentes queseros, ya que es más rica en caseínas totales que la de vaca y cabra (Assenat, 1985). Es habitual decir que, para cantidades de leche idénticas, se obtiene unas dos veces más de queso con la leche de oveja que con la de vaca. La leche de oveja produce una cuajada dura y la pasta es, en general, más blanca. Las diferencias en las caseínas de las leches de diferentes especies, influyen en el tiempo de coagulación por enzimas y en la firmeza del coágulo. Así, la leche de oveja coagula 1,56 veces antes que la leche de vaca y la firmeza del coágulo es 2 veces mayor. Finalmente, el bajo contenido de caseínas del grupo α_s de la leche de oveja se relaciona con la casi ausencia de sabores amargos en los quesos fabricados con esta leche, lo que también se observa en la leche de cabra, con un contenido muy bajo de caseínas α_s .

II.5.1. CASEINA α_{s1}

El contenido de caseína α_{s1} de la leche de cabra es menor que en la de vaca. Richardson y Creamer (1975) fraccionaron y analizaron los componentes de la caseína caprina, encontrando que el componente α_s caprino tenía más homología con el componente α_{s2} bovino que con el α_{s1} , por lo que se pensó que esta última proteína se encontraba

ausente de la leche de cabra. Actualmente se conoce por estudios electroforéticos (SDS-PAGE alcalina) y de FPLC, que la variabilidad existente en la literatura sobre el porcentaje de esta caseína (5%-25% de la proteína total), se debe a que en la cabra el locus α_{S1} es extremadamente polimorfo y se encuentra asociado a una variabilidad alélica cuantitativa (Boulanger y col., 1984; Grosclaude y col., 1987; Mahé y Grosclaude, 1989; Law y Tziboula, 1992), con al menos 7 alelos que se distribuyen en 4 clases cuantitativas. También se conoce que los alelos α_{S1} A, B, C se encuentran asociados a una tasa elevada de caseína α_{S1} (3,6 g/por alelo), el alelo α_{S1} E se asocia a una tasa media (1,6 g/l, por alelo), los alelos α_{S1} F y D se encuentran asociados a una tasa reducida (0,6 g/l, por alelo) y el alelo α_{S1} O confiere el fenotipo "nuño", es decir, que la leche de animales homocigotos para el alelo O/O en el locus α_{S1} , carece de caseína α_{S1} (Martín, 1993).

Así mismo, la variación en la cantidad relativa de caseína α_{S1} de la leche de cabra, origina una variación considerable de las cantidades relativas de α_{S2} , β y κ . Generalmente, si el contenido de α_{S1} se incrementa, el de la caseína κ también es importante; sin embargo, si la muestra contiene α_{S1} F el contenido de caseína κ se reduce, aumentando el contenido de caseína β . En la Tabla II.6., se muestra la composición caseínica de las leches de vaca, oveja y cabra determinada por FPLC en columnas Mono S.

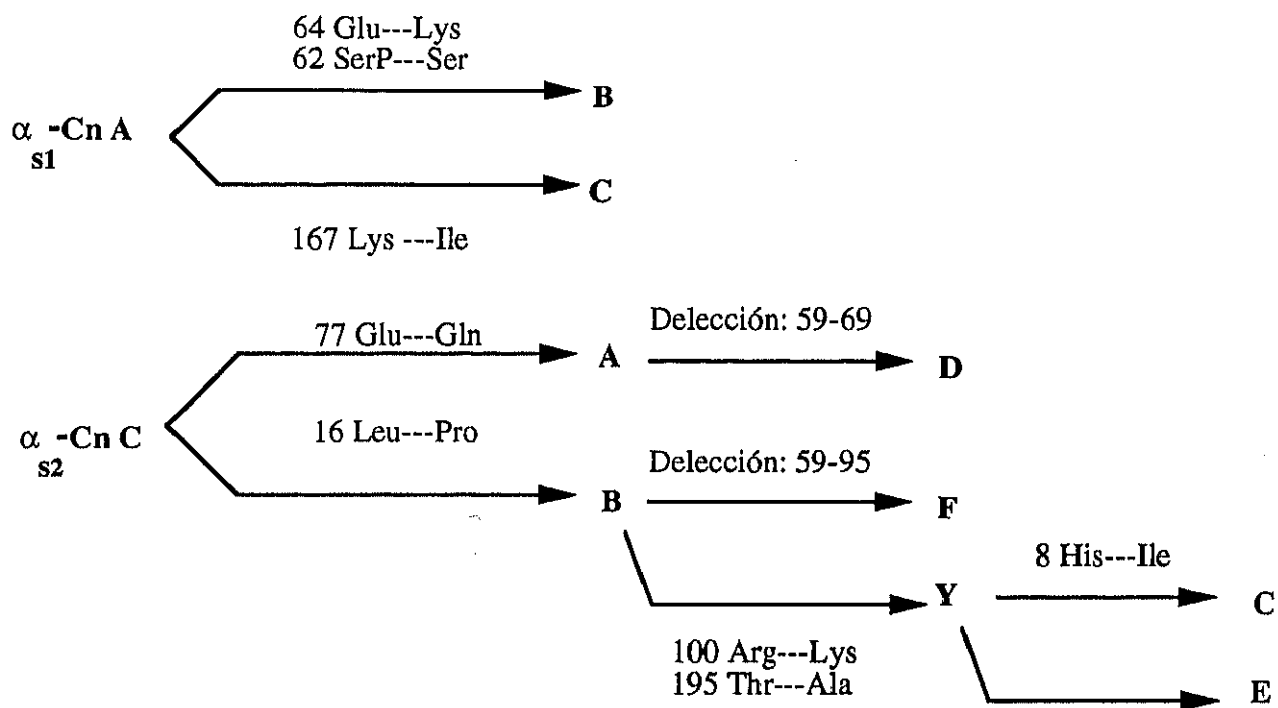
La estructura primaria de las variantes de la caseína α_{S1} caprina ya se conoce (Brignon y col., 1989; 1990). Las variantes A, B, C y E se diferencian sólo en algunas sustituciones aminoacídicas, mientras que las variantes D y F presentan alteraciones estructurales más profundas, como 2 delecciones enteras de 11 y 37 aminoácidos, respectivamente, incluyendo el lugar de fosforilación múltiple de esta caseína (Figura II.10.). La variante A se diferencia de la B por las sustituciones Pro---Leu en posición 16 y Glu---Gln en posición 77, las variantes C y E poseen un residuo lisina en posición 100 y un residuo alanina en posición 195, mientras que los otros alelos presentan, respectivamente, en estas 2 posiciones un residuo Arg y uno Thr. La variante C, se diferencia de las otras por la presencia de un residuo isoleucina en posición 8.

En la leche de oveja se han detectado electroforéticamente varios componentes de la caseína α_S , algunos de los cuales pueden ser variantes genéticas y que se han identificado como componentes caseínicos α_{S1} , α_{S2} y α_{S3} ; su composición en aminoácidos es idéntica entre sí (difieren sólo en un grupo fosfato) y similar a la α_{S1} bovina, pero se diferencian de ésta por su mayor sensibilidad al calcio (Richardson y Creamer, 1976). Por otra parte, el

Tabla II.6. Composición Caseínica de las Leches de Vaca, Oveja y Cabra, determinada por FPLC en Columnas Mono S

	VACA	OVEJA	CABRA
CASEINA	% CASEINA TOTAL		
α_{s1}	36,2		4,4 - 2,6
α_{s2}	10,2	34,2	5 - 19
β	40,8	50,4	42,2 - 64
κ	10,1	10,8	9,8 - 23,5
Minoritarias	2,8	4,6	6,9 - 15

Fuente: Law y Tziboula, 1992



β -Cn A, B, O

κ -Cn A, B

α -La A, B

β -Lg A, B

Figura II.10. Polimorfismo genético de las 6 lactoproteínas caprinas
(Martín, 1993)

componente α_{s2} presenta 11 residuos aminoacídicos diferentes respecto de la variante genética α_{s1} B bovina, mientras el componente α_{s3} presenta 12 residuos diferentes si se compara con la misma variante (Jeness, 1982).

Al evaluar la acción de la quimosina en la caseína α_{s1} de las leches de vaca y cabra, Addeo y col. (1988) determinaron que la α_{s1} bovina es más sensible a la acción de la quimosina que las α_{s2} y β , que la caseína α_{s1} de cabra se hidroliza cerca de la región N-terminal (igual a la de vaca) y que los productos de degradación son iguales en ambas caseínas; tales productos se conocen como péptidos α_{s1} -I, cuya formación se debe a que el enlace peptídico Phe (23)-Phe (24) de la caseína α_{s1} bovina, es tan lábil a la quimosina como el enlace Phe (23)-Val (24) de la caseína caprina.

II.5.2. CASEINA α_{s2}

La caseína α_{s2} de la leche de cabra es también polimorfa y se encuentra en mayor proporción que en la leche de vaca. Su estructura primaria se diferencia de la de vaca por una inserción de un residuo Asn entre los residuos Ile 14 e Ile 15 de la caseína α_{s2} bovina, por lo que su composición aminoacídica es de 208 aminoácidos (uno más que en la bovina). De esta caseína se conocen dos variantes, A y B detectadas por Boulanger y col. (1984) y cuyo análisis bioquímico indica que las sustituciones aminoacídicas que las diferencian son una sustitución Glu---Lys en la posición 64, que afecta a un lugar de fosforilación (Ser 62) y una sustitución Lys---Ile en posición 167 (Bouniol y col., 1993).

II.5.3. CASEINA β

Es la proteína mayoritaria de la leche de cabra, encontrándose en mayor proporción que en la leche de vaca. Su estructura primaria se diferencia de la de vaca por una delección del dipéptido Pro 179-Tyr 180, destacando de la caseína β caprina, que al contrario que su homóloga bovina, existe bajo dos formas β_1 y β_2 (Richardson y Creamer, 1974), en proporciones sensiblemente iguales y que no difieren más que en el número de residuos fosforilados (6 para la β_1 y 5 para la β_2). Esta caseína se ha considerado monomorfa durante mucho tiempo, hasta que Dall'Olio y col. (1989) determinaron la existencia de un alelo probablemente nulo. Recientemente, Mahé y Grosclaude (1993) han detectado la existencia de 4 alelos diferentes de esta caseína.

La caseína β de la leche de oveja, al igual que su homóloga caprina, tiene 2 componentes con la misma composición aminoacídica, que sólo se diferencian porque la β_1 tiene un grupo fosfato más que la β_2 y es más sensible a los iones calcio (Richardson y col., 1978), mientras su secuencia aminoacídica se diferencia de su homóloga bovina en al menos 15 aminoácidos (Richardson y Mercier, 1979). De la leche de oveja también se han aislado proteínas similares a las γ de la leche de vaca (Jeness, 1982).

II.5.4. CASEINA κ

La caseína κ caprina consta de 171 aminoácidos frente a los 169 de su homóloga bovina, debido a la inserción de un dipéptido Val-His entre los residuos Thr-131 y Ser-132. Los 2/3 de las diferencias observadas entre las caseínas κ bovina y caprina, se localizan en la zona C-terminal de la molécula correspondiente al caseinomacropéptido (bovino 106-169 y caprino 106-171), es decir, en la región más hidrófila de la molécula que se libera en la coagulación enzimática de la leche por la quimosina (Figura II.11.).

Se conocen dos variantes genéticas de la caseína κ caprina, que se diferencian por una sustitución localizada en la porción N-terminal de la molécula (para- κ -caseína) y que se denominan A y B por analogía con las variantes bovinas (Di Luccia y col., 1990). Además, debido a la glicosilación de esta caseína, Addeo y col. (1988) identificaron al menos 5 formas diferentes en la especie caprina. Alais y Jolles (1967), encontraron algunas diferencias en la caseína κ ovina en relación a la bovina, tanto en la composición aminoacídica, como en el grado de glicosilación; sin embargo ambas comparten el papel estabilizador de la estructura micelar.

Las para- κ -caseínas de vaca, oveja y cabra se han secuenciado completamente, con diferencias en la posición de algunos aminoácidos en la de entre vaca-oveja, vaca-cabra y oveja-cabra (Tabla II.7.). La sustitución de aminoácidos en las para- κ -caseínas bovina, caprina y ovina, principalmente en la posición 19 (Ser en bovina y Asp en ovino) hace que la carga negativa aumente de la bovina a la caprina, siendo intermedia en la ovina, lo que permite diferenciarlas por isoelectroenfoque (Amigo, 1989a). La estructura correspondiente del enlace sensible a la quimosina se encuentra conservado en las 3 especies (Mercier y col., 1976).

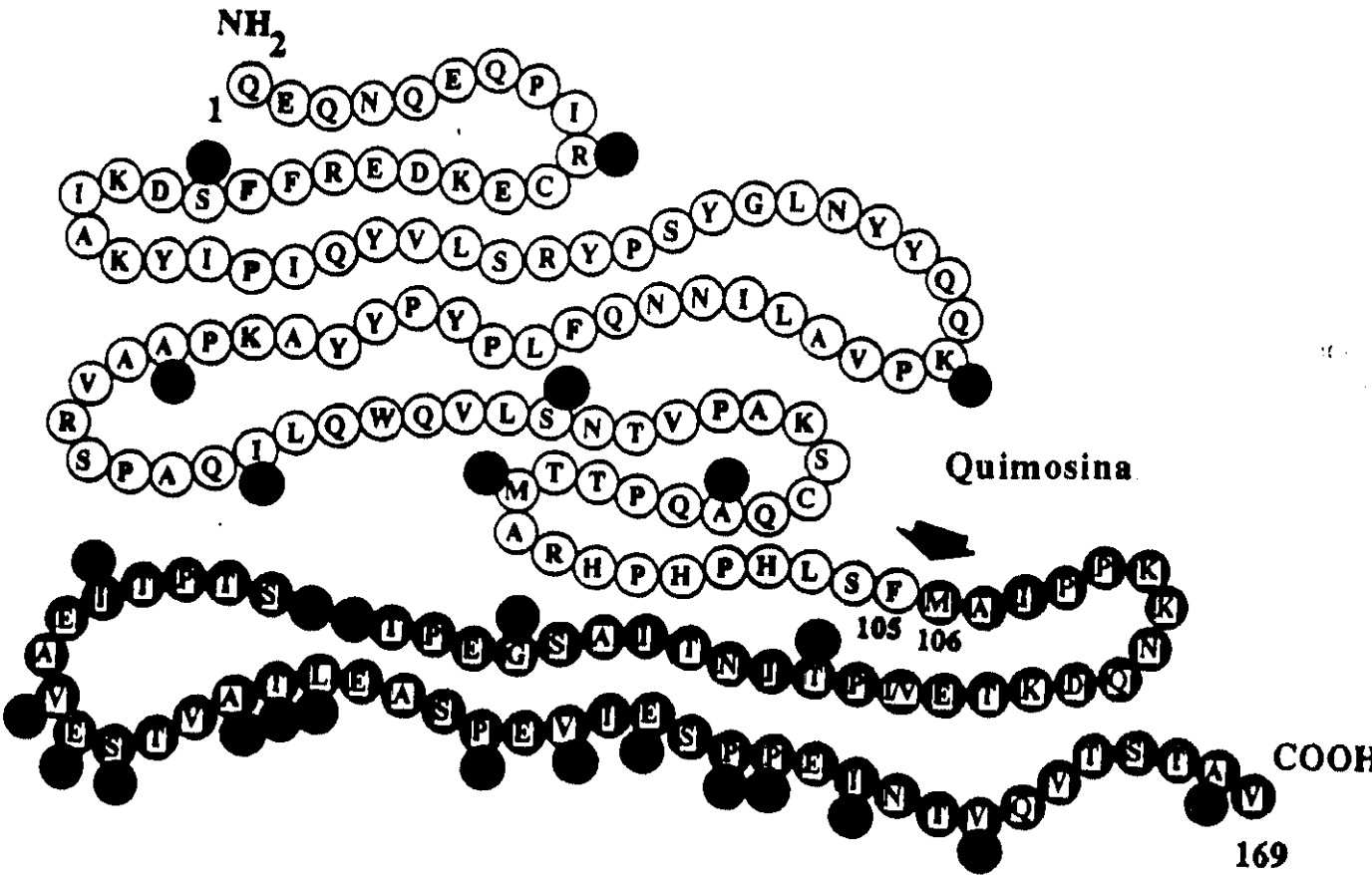


Figura II.11. Comparación de las secuencias aminoacídicas de las caseínas κ Bovina y Caprina (Martín, 1993)

Tabla II.7. Comparación de la Secuencia de las Para- κ -Caseínas de Vaca, Oveja y Cabra

	8	10	19	46	65	73	80	82	90	94
VACA	Pro	Arg	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Thr	Ala	Thr
OVEJA	Arg	Cys	Asp	Arg	Val	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala
CABRA	Pro	Cys	Asp	Arg	Val	Thr	Pro	Thr	Asp	Thr

Fuente: Amigo, 1989

II.6. OTRAS PROTEÍNAS LACTEAS

II.6.1. PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

El término proteínas del suero se emplea para designar aquellas proteínas solubles a pH 4,6 y 20 °C, que se caracterizan por ser proteínas globulares sujetas a la desnaturalización por calor. No obstante, también se incluyen bajo esta denominación fragmentos de la caseína β , como las proteosas-peptonas 5, 8-lento y 8-rápido, que son estables al calor y se encuentran formando parte de las micelas de caseína al pH normal de la leche (Eigel y col., 1984). Las proteínas más significativas de este grupo: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas son proteínas globulares debido a la distribución uniforme de sus restos polares y no polares, a la ausencia de fósforo y a su bajo contenido en prolina. Estas características, unidas a un alto contenido en cistina, cisteína y metionina, hacen que sean más inestables térmicamente que las caseínas y que al calentar la leche pierden solubilidad (Walstra y Jeness, 1987). Las proteínas citadas no están sometidas a las modificaciones post-traduccionales que sufren las caseínas (glicosilación y fosforilación), aunque se conocen variantes genéticas de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina (Grosclaude, 1988).

La separación de los componentes individuales de las proteínas del suero, se realizó originalmente por fraccionamiento, debido a diferencias de solubilidad y por cristalización. Actualmente, los métodos de fraccionamiento preferidos, tanto con fines analíticos como preparativos, son los de cromatografía de filtración en geles y de intercambio iónico.

II.6.1.1. β -LACTOGLOBULINA

La β -lactoglobulina por sus características estructurales y su aptitud para fijar el retinol, parece ser que estaría implicada en el transporte de este precursor de la vitamina A hacia unos receptores situados en la superficie de las células de las vellosidades intestinales (Papiz y col., 1986; Monaco y col., 1987). Es la proteína soluble cualitativamente más importante, ya que se encuentra en la leche a una concentración de unos 3 g/l, tiene 162 aminoácidos y un peso molecular de 18,277 daltons (Grosclaude y col., 1976), con 5 cisteínas que le permiten crear puentes disulfuro (-S-S-) intra o intermoleculares, que estabilizan la dimerización de esta proteína al pH normal de la leche. La unión entre la caseína κ y la β -lactoglobulina de la leche calentada, se debe a un enlace disulfuro entre estas dos moléculas. En la β -lactoglobulina se han detectado 4 variantes genéticas, se conoce que la variante B se diferencia de la C por una mutación en la posición 59 (Gln---His); de la D

por una sustitución en la posición 45 (Glu---Gln) y de la variante A por dos mutaciones en las posiciones 64 (Gly---Asp) y 118 (Ala---Val).

II.6.1.2. α -LACTOALBUMINA

La α -lactoalbúmina interviene en la síntesis de la lactosa, al modificar la actividad de la galactosiltransferasa, permitiendo que la uridín difosfato (UDP)-galactosa con la glucosa origine la lactosa (Ebner y Brodbeck, 1968; Rood y Thomas, 1980). Esta proteína se encuentra en la leche de vaca a una concentración de 0,7 g/l. La variante B consta de 123 aminoácidos, de los que 8 son cisteínas, que forman 4 puentes disulfuro y tiene un peso molecular de 14,174 daltons. La variante A difiere de la B por una sustitución aminoacídica en la posición 10 (Gln en la A y Arg en la B).

II.6.1.3. ALBUMINA SERICA BOVINA

Esta proteína, uno de los componentes mayoritarios del suero sanguíneo, que se sintetiza en el hígado y llega a la leche por las células secretoras supone solamente el 1,2%, aproximadamente, de las proteínas lácteas totales, siendo idéntica en todas las propiedades a la albúmina del suero sanguíneo (Polis y col., 1950). Su estructura primaria consta de 582 aminoácidos con un peso molecular de 66,267 daltons (Brown, 1975; Reed y col., 1980). Se desconoce la función específica que pueda desempeñar en la glándula mamaria, y es poco lo que se sabe de su comportamiento en la leche y en los productos lácteos así como de su posible influencia en las propiedades de estos alimentos.

II.6.1.4. INMUNOGLOBULINAS

Estas proteínas no son específicas de la secreción láctea, puesto que se sintetizan por los linfocitos B (Ribadeau-Dumas, 1981) y se transportan por la sangre a todos los fluidos del cuerpo. Todas las inmunoglobulinas son glicoproteínas, que son monómeros o polímeros de una molécula de cuatro cadenas formada por dos cadenas ligeras (20,000 peso molecular) y dos cadenas pesadas (50,000-70000) unidas por puentes disulfuro (Butler, 1974; Lascelles, 1977). Las principales inmunoglobulinas en la leche son la IgM, la IgA y la IgG, que es la mayoritaria (Guidry y col., 1980).

II.6.2. PROTEINAS DE LA MEMBRANA DEL GLOBULO GRASO

Los glóbulos grasos de la leche están rodeados de una fina membrana (King, 1955), formada por una mezcla compleja de lípidos y proteínas y aunque algunas de estas proteínas son enzimas, es todavía difícil estimar la proporción de componentes enzimáticos y no enzimático. Dichos glóbulos contienen un 50% de proteína, lo que supone, aproximadamente, un 1% del total de la proteína de la leche. Las proteínas de la membrana del glóbulo graso son difíciles de resolver y separar analíticamente, porque interactúan fuertemente entre sí y con los lípidos; la mayoría son insolubles.

II.6.3. PROTEINAS MINORITARIAS

En la leche existen pequeñas cantidades de dos proteínas ligantes de hierro: la transferrina y la lactoferrina, que son cadenas polipeptídicas sencillas de peso molecular de 600 a 700 daltons y que ligan dos moles de hierro por molécula (Jeness, 1982). La transferrina parece ser idéntica a la existente en el plasma sanguíneo y su peso molecular es de 75,000 a 77,000 daltons (Leger y col., 1977), mientras la lactoferrina tiene un peso molecular, que varía según los autores, de 77,000 a 93,000 daltons (Leger y col., 1977). Ambas proteínas son significativamente diferentes, tanto en su composición aminoacídica como inmunológicamente (Gordon y col., 1963).

Otras proteínas minoritarias del suero de la leche son la familia de las M-1 glicoproteínas aisladas por Bezkorovainy (1965; 1967) de la leche y el calostro; una proteína ligante de cobre se detectable por inmunodifusión (Hanson y col., 1967); un inhibidor de la tripsina encontrado en el calostro (Laskowski y Laskowski, 1950; 1951); un quinínogeno aislado del suero de la leche por Leach y col. (1967) y una proteína ligante de folato (FBB), aislada de la leche de vaca (Salter y col., 1972).

II.6.4. ENZIMAS

En la leche se han detectado numerosos enzimas, asociados a las micelas de caseína, a los glóbulos grasos o a los leucocitos, mientras otros se encuentran dispersos en el suero. Una descripción más detallada de los mismos puede encontrarse en Walstra y Jeness (1987). En el caso que nos ocupa, merece destacarse que la actividad del enzima xantín-oxidasa es 10 veces superior en la leche de vaca que en la de cabra, por lo que esta característica se ha empleado para diferenciar las leches de ambas especies (Amigo, 1989a).

II.7. QUESOS

Según el Real Decreto 503/1086 del 21 de febrero de 1986 (B.O.E., 14/III/1986), los quesos se definen como: "El producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa". Asimismo, se entiende por queso fundido: "El producto obtenido por molturación y/o mezcla, fusión y emulsión con tratamiento térmico de una o más variedades de queso con o sin la adición de agentes emulgentes, de leche y productos lácteos y de otros productos alimenticios".

II.7.1. CLASIFICACION DE LOS QUESOS ESPAÑOLES

España es un país de contrastes que sin duda se reflejan en su cultura, sus gentes y como, expresión gastronómica, en sus quesos. De la complejidad de la elaboración de los quesos y de los factores a considerar en la descripción de los mismos, es comprensible que resulte difícil establecer una clasificación general de todos los tipos de quesos.

Por ello, existen varios criterios para su clasificación. Una modalidad muy extendida es la basada en el tipo de leche utilizada en su elaboración, por lo que puede hablarse de queso de vaca, oveja o cabra. Sin embargo, el criterio de clasificación más aceptado es aquel que se establece en función de su maduración: quesos frescos y quesos fermentados, maduros o curados.

La legislación española, consciente de la dificultad de los criterios de clasificación pero a su vez considerando necesario establecer unas normas mínimas de regulación de la calidad, ha establecido una clasificación basada en uno de los componentes del mismo: el contenido graso. Siguiendo este criterio, la legislación española los clasifica los quesos de la forma siguiente: a) Extragrasso: contenido en grasa sobre extracto seco como mínimo del 60%; b) Grasso: contenido graso mínimo del 45% sin llegar al 60%; c) Semigrasso: mínimo del 25% sin llegar al 45%; d) Semidesnatado: mínimo del 10% sin llegar al 25% y e) Desnatado: menor del 10%.

De entre los numerosos sistemas de clasificación de los quesos, que obedecen a criterios distintos, nosotros vamos a seguir una clasificación comercial (Herrero, 1992) por ser práctica y sencilla (Tabla II.8).

Tabla II.8. Quesos Españoles

TIPO DE QUESO	ESPECIE PRODUCTORA			
	VACA	OVEJA	CABRA	MEZCLA
<u>Frescos</u>	Burgos Villalón		Alicante Cádiz Camerano Murcia	Cassoleta La Nucia Mató Pido Porrúa Tenerife
<u>Tiernos</u>	Cantabria (D. O.) Afuega'l Pitu Ulloa o Arzúa Cebreiro Del León Pasego La Selva Tetilla Vidiago	La Bureba Cáceres Torta del Casar	Babia Laciana Garrotxa Málaga La Vera	Beyos Flor de Guía Quesuco Servilleta
<u>Semicurados y curados</u>	Benasque Casín Mahón (D. O.) San Simón Valle de Arán	Anso-Hecho Castellano Idiazábal (D. O.) Manchego (D. O.) Oropesa Pedroches Roncal (D. O.) La Serena Serrat Zamorano	Acehuche Albarracín Alhama de Granada Aracena Buelles Conejero Gata-Hurdes Ibores Majorero Montsec Murcia al vino Balmero Quesailla Sierra Morena Tiétar Valdetejo	Ahumado de Aliva La Calahorra Genestoso de la Gomera Grazalema Herreño Mallorquín Peñamellera Tronchón Ibérico Hispánico De la Mesta
<u>Azules especiales</u>	Cabrales (D. O.), Gamonedo, La Peral, Picón, Valdeón, La Armada, Urbiés, Cremas de Queso Azul (Valdeón), Cremas de coagulación láctica con o sin sabores, con especias, etc, sabores, con especias, etc.			

D.O. : Denominación de Origen

Fuente: Herrero, 1992

II.7.1.1. QUESOS DE ESPAÑA CON DENOMINACION DE ORIGEN Y GENERICA

Para proteger nuestros productos y asegurar la calidad de los quesos, en España se han creado las "Denominaciones de Origen", definidas según ley 25/1970 en su artículo 69 como: "Se entiende por denominación de origen el nombre geográfico de la región, comarca, lugar o localidad empleado para designar un producto procedente de la respectiva zona, que tenga cualidades y caracteres diferenciales debidos principalmente al medio natural y a su elaboración". De esta definición se desprende que ha de existir una doble conexión entre el nombre geografico constitutivo de la denominación de origen y el producto diferenciado por ella. Por tanto, ese nombre geográfico ha de emplearse para designar quesos producidos exclusivamente en la región o comarca que le da nombre y, además, dicho queso deberá poseer determinadas cualidades y caracteres que han de ser debidas principalmente a ese medio geográfico. Esquemáticamente, se puede decir que los criterios generales a tener en cuenta para el reconocimiento y reglamentación de una denominación de origen son: a) La existencia de un queso conocido por el nombre geográfico de su región de procedencia; b) La delimitación de una zona de producción; c) El empleo de unos métodos de producción y elaboración tradicionales y locales; d) La presencia en el queso de unos caracteres diferenciales, ligados a la zona de producción y a los sistemas de elaboración locales, y e) Un sistema de control y garantía suficiente.

Para asegurar el cumplimiento de estos criterios, cada denominación de origen está regulada por un Reglamento, aprobado por la Comunidad Autónoma correspondiente y ratificado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Este reglamento establece la composición y fundamento del Consejo Regulador, que es el órgano interprofesional encargado del control y la defensa de la denominación de origen. En la Tabla II.9., hemos recogido los quesos de España con Denominación de Origen y Genérica.

II.7.2. LA LECHE PARA LA FABRICACION DEL QUESO

La leche de todos los mamíferos puede destinarse a la producción de quesos, pero por razones puramente prácticas, la leche de los mamíferos domésticos ha dominado la producción quesera. La fuente primaria depende de la zona de producción, ya que mientras la leche de vaca domina la producción en las zonas llanas, en las zonas de montaña se utiliza la leche de oveja o de cabra en la producción de quesos. Aunque existen diferencias de composición de la leche dependiendo de la especie productora, lo que puede afectar la

Tabla II.9. Quesos Españoles con Denominación de Origen y Genérica

QUESO	ZONA	LECHE	ORDEN MINISTERIAL
Roncal	Navarra (valle de Roncal)	Oveja (Rasa y Lacha)	11/3/91
Mahón	Menorca	Vaca (cruda o pasteurizada)	24/11/93
Cabrales	Cabrales y algunas localidades de Peñamerana Alta	Mezcla (vaca, oveja y cabra)	29/6/90
Cantabria	Cantabria, excepto las cuencas hidrográficas de Urdón y Cervera	Vaca (Frisona pasteurizada)	29/10/85
Manchego	Ciudad Real, Albacete, Cuenca y Toledo	Oveja (Manchega)	21/12/84
Idiazábal	País Vasco	Oveja (Lacha y Carranzana)	30/11/93
Zamorano	Zamora	Oveja (Churra y Merina)	6/5/93
La Serena	Comarca de La Serena	Oveja (Merina), leche cruda o pasteurizada	14/4/93
Picón-Bejes-Tresvijo Quesucos de Liébana	Comarca de Liébana	Bovina (Tudanca, Pardo Alpina y Frisona); Ovina (Lacha); Caprina (Pirenaica y Cabra de los Picos de Europa)	6/10/87

Fuente: Industrias Lecheras, 1993

calidad del queso producido, en muchos aspectos las leches tienen mucho en común. Las dos formas mayoritarias de proteínas de la leche (caseínas y proteínas del suero) son esenciales en la fabricación del queso y, de estas dos, la fracción caseínica es la más importante. Las caseínas no sólo representan aproximadamente el 70-80% de las proteínas de la leche sino que, además, forman la matriz de la cuajada quesera y en última instancia el queso por sí mismo. Sólo si el queso procede de leche sometida a ultrafiltración o a tratamientos severos de calor, las proteínas del suero se consideran una fracción importante. En el primer caso, las proteínas séricas quedan atrapadas durante el procesamiento de la leche, mientras que en el segundo son desnaturalizadas y se adsorben en la superficie de las caseínas (Robinson, 1995).

La fracción caseínica consta de cuatro tipos de proteínas y cada una de ellas es una fosfoproteína diferente. La presencia de residuos fosforilados es importante por dos razones: a) influencia los puntos isoeléctricos alrededor de pH 4.5-5.0, y b) los residuos fosforilados pueden unirse a los iones calcio. Las moléculas de caseína permanecen aisladas o combinadas con iones calcio o fosfato cálcico, formando las llamadas micelas de caseína. Estos complejos contienen miles de unidades de caseína y la parte central de los mismos está formada por caseínas α y β , mientras que en la superficie se encuentra la caseína κ (Dalglish y col., 1989). Es la presencia de la caseína κ hacia el exterior de las micelas, lo que impide que las α y β caseínas formen agregados y precipiten espontáneamente.

Por otra parte, cuando se produce la coagulación de la leche durante la fabricación de queso, el enzima quimosina, presente en el cuajo, escinde la caseína κ , dejando a las otras caseínas desprotegidas. Como consecuencia, las micelas comienzan a agruparse en presencia de iones calcio. El efecto de este enzima sobre las otras caseínas es despreciable en un período de tiempo corto, pero en quesos con un período de maduración largo las caseínas α y β pueden ser hidrolizadas por enzimas proteolíticos, presentes en el cuajo con la quimosina. Esta acción puede ser importante en relación con el desarrollo del sabor (Fox, 1989), lo que también depende de la especie lechera. En la leche de vaca, las caseínas α_{s1} y β son los componentes mayoritarios, pero en la leche de oveja y de cabra las dos formas de caseína β son las principales fracciones y, ambas, son diferentes a la caseína β de la leche de vaca. Asimismo, la caseína α_{s2} se encuentra en mayor proporción en las leches de oveja y cabra que en la de vaca y estas diferencias pueden ser importantes en el sabor de un queso determinado. Cuando en la legislación de los quesos se utiliza sólo la coagulación ácida, como sucede en la India y Sudamérica la caseína κ permanece intacta y es la inestabilidad de las caseínas alrededor de su punto isoeléctrico lo que determina su precipitación. El resultado es un gel blando manipulable para modificar las propiedades organolépticas del

producto final. La naturaleza de las caseínas es importante respecto de la fuerza (resistencia) del gel; las caseínas β que dominan en la leche de cabra, originan un gel más fuerte que el obtenido con la leche de vaca (Robinson, 1995).

El otro componente mayoritario de los quesos es la fracción lipídica, en la que algunos valores típicos de esta fracción en las diferentes especies lecheras son: leche de vaca 3,5-5,0%, leche de oveja 5,8-9% y leche de cabra 2,8-6,5% (Tamime y col., 1991). La fracción lipídica está formada mayoritariamente por triglicéridos, aunque los ácidos grasos libres están ampliamente repartidos por la leche. Durante la fabricación del queso, los lípidos de la leche son retenidos junto con las proteínas, por lo que en los quesos de pasta dura alrededor del 45% de los sólidos totales corresponde a la grasa, mientras el resto son proteínas con niveles bajos de lactosa y sales minerales. Aunque la mayoría de la lactosa se pierde con el suero durante la fabricación del queso, este disacárido es esencial durante los primeros estadios de la fabricación quesera, ya que este azúcar es utilizado por los cultivos iniciadores en la producción de ácido láctico. La lactosa soporta, al menos en parte, el crecimiento de los mohos, levaduras y bacterias asociadas con la maduración de variedades queseras como el Brie, así como el de las bacterias formadoras de gas en los quesos con ojos. Algunos minerales, como el calcio y el fósforo, son también esenciales en la coagulación de la leche y los iones calcio en particular juegan un papel importante en la agregación de las micelas de caseína, lo que hace que el queso sea una fuente excepcional de calcio en la dieta (Robinson, 1995).

II.7.3. COMPORTAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS LACTEAS DURANTE LA FABRICACION DEL QUESO

Las diversas fases de elaboración de los quesos influyen decisivamente en la estructura y conformación de las proteínas de la leche y, en particular, de las caseínas. Durante la transformación de la leche en queso, ocurre una deshidratación en la que la grasa y las proteínas se concentran de 6 a 10 veces, dependiendo de la variedad. La deshidratación se consigue mediante una coagulación ácida o isoelectrica de la caseína, aunque la mayoría de los quesos madurados proceden de una coagulación enzimática producida por el cuajo. La proteólisis, además de ejercer un papel fundamental durante la manufactura, se considera por muchos autores como el proceso más importante en el desarrollo del sabor y la textura del queso, con la excepción de los quesos azules y algunas variedades italianas, en los que predomina la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos, aunque la proteólisis también es importante (Fox, 1989).

II.7.3.1. COAGULACION

La coagulación consiste en la conversión de la leche líquida en un gel, lo que se debe a la ruptura del equilibrio coloidal en el que se encuentran las partículas de fosfocaseinato cálcico, lo que origina que precipiten las micelas de caseína y formen un gel tridimensional que retiene grasa, agua, sales, etc. La coagulación puede ser por acidificación (coagulación ácida) o por la acción de enzimas coagulantes (coagulación enzimática) (López-Fandiño, 1992).

La coagulación ácida se produce por una disminución progresiva del pH de la leche, debido al ácido láctico originado por la degradación microbiana de la lactosa por las bacterias lácticas o por la adición a la leche de un ácido mineral u orgánico. El descenso del pH disminuye la ionización de los radicales ácidos de las caseínas, con un desplazamiento progresivo del calcio y del fosfato inorgánico de las micelas hacia la fase acuosa (lactosuero) y una desmineralización de las mismas a pH menores de 5. La salida del calcio y del fosfato, se acompaña de una desintegración de la estructura micelar (Brule y Lenoir, 1990). La temperatura óptima del proceso es de 20°C y la velocidad de acidificación debe ser progresiva, si se desea obtener un coágulo liso y homogéneo.

La coagulación enzimática la realizan muchos enzimas proteolíticos, pero el que se utiliza más frecuentemente es el cuajo de rumiantes lactantes (cabritos, terneros y corderos) cuyo principio activo mayoritario es la quimosina o renina. La coagulación de la leche por el cuajo se considera un proceso constituido por dos etapas. La primera comprende la ruptura enzimática de la caseína κ en para- κ -caseína y péptidos. La caseína κ se hidroliza por la ruptura del enlace Phe105-Met106, que es el más susceptible a la hidrólisis por proteinasas ácidas que cualquier otro dentro de las proteínas lácteas; se cree que, la estructura que lo rodea es también importante para una ruptura eficaz por los enzimas proteolíticos (Fox, 1989). La ruptura de este enlace divide a la proteína en dos partes muy diferentes, la para- κ -caseína (1-105), ligeramente catiónica a pH 6,6, hidrofóbica, pero soluble y que posee una estructura secundaria relativamente estable y lo que se conoce como caseinomacropéptido o glicomacropéptido (GMP), polar, poco estable y que contiene todas las modificaciones post-translacionales y genéticas; su contenido en aminoácidos y azúcares lo hacen fuertemente polar, por lo que difunde hacia la fase acuosa, eliminándose durante el desuerado con el suero de quesería (Swaisgood, 1982). La hidrólisis de la caseína κ depende de muchos factores como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, el grado de glicosilación o el tratamiento térmico de la leche.

La segunda etapa deriva de que la proteólisis de la caseína κ reduce el potencial zeta y la estabilización estérica de las micelas de caseína. La pérdida del caseinomacropéptido, que posee la mayor parte de la carga negativa de la molécula, convierte la superficie de la micela, donde permanece la para- κ -caseína en una zona muy hidrofóbica. Cuando el 85% de la caseína κ se ha hidrolizado, las micelas comienzan a agregarse y gelificar en presencia de calcio y a temperaturas superiores a los 20°C (Dalglish, 1987).

La cuajada enzimática es de consistencia blanda, gelatinosa, flexible, elástica, compacta, casi impermeable y expulsa el suero al fraccionarla. La cuajada idónea es, en la mayoría de los casos, la que posee propiedades intermedias entre el coàgulo enzimático y el ácido. La producción de ácido láctico por las bacterias del fermento tiene numerosas repercusiones (Amigo, 1989b): proporciona el pH adecuado para la acción del cuajo, facilita la expulsión del suero (lo que determina el nivel de humedad durante la maduración); mantiene los niveles de cuajo residual en la cuajada y controla, también, los de la plasmina retenida; confiere a la cuajada ciertas características físicas de las que depende la textura final, controla el crecimiento microbiano e influye en la actividad de los enzimas que participan en la maduración.

II.7.3.2. MADURACION

Los procesos proteolíticos que tienen lugar durante la maduración, además de contribuir al gusto y aroma del queso, potencian el sabor al favorecer la liberación de compuestos sápidos durante la masticación. Por otra parte, determinan el desarrollo de la textura, debido a la ruptura de la malla de caseína y al aumento de pH que originan a través de la formación de amoníaco (Figura II.12.). En el queso viene la actividad proteolítica determinada por los agentes proteolíticos presentes (bacterias del fermento y sus enzimas, proteasas lácteas nativas, enzimas exógenos añadidos como coagulantes y las proteasas producidas por las bacterias contaminantes) y por las condiciones físico-químicas del proceso de maduración (relación sal-humedad, temperatura, pH, potencial de óxido-reducción y el contenido de calcio) (López-Fandiño, 1992).

II.7.3.2.1. **Acción del cuajo**

Durante la maduración de los quesos, el agente coagulante enzimático hidroliza los enlaces Phe23-Phe24 o Phe24-Val25 de la α_{s1} , dando lugar al péptido α_{s1} -I (Creamer y Richardson, 1974; Hill y col., 1974), cuya concentración aumenta con la edad del queso

(Creamer y Richardson, 1974), aunque simultáneamente sufre degradaciones posteriores por el cuajo u otras proteasas, llegando incluso a desaparecer al final de la maduración (Reville y Fox, 1978). En el caso de la quimosina, las otras fracciones caseínicas resultan más resistentes a la proteólisis, destacando dos factores (Visser, 1981): la especificidad del enzima (que ataca fundamentalmente los enlaces Leu-X y Phe-X) y la accesibilidad del enlace peptídico. El nivel de NaCl induce la agregación de la caseína β y reduce la disponibilidad de los enlaces de esta proteína sensibles a la quimosina, lo que en el caso de la caseína α_{S1} , depende de su grado de entrecruzamiento por la formación de enlaces disulfuro. Tanto la α_{S2} como la para- κ -caseína, son resistentes a la quimosina (Green y Foster, 1974). El tipo de coagulante utilizado posee gran importancia, sobre todo en lo que respecta a la textura del queso (Birkkjær y Johnk, 1985).

II.7.3.2.2. Proteasas nativas de la leche

De modo natural, la leche contiene una proteasa alcalina y, en menor proporción, una proteasa ácida y aminopeptidasas, pero es la proteasa alcalina o plasmina, la que ejerce una actividad predominante. En la leche fresca, la plasmina se encuentra asociada a las micelas de caseína, disociándose a medida que disminuye el pH (Richardson y Elston, 1984). Cuanto menor es el pH durante el desuerado, menos plasmina quedará retenida en el queso. La plasmina es la responsable de la ruptura inicial de las caseínas, sobre todo en quesos cuya cuajada se calienta, inactivándose el cuajo (Matthesson, 1981). En casi todos los tipos de quesos se acumulan importantes cantidades de caseínas γ , lo que es indicativo de la actividad de la plasmina, aunque este enzima es particularmente activo en aquellas variedades cuyo pH aumenta durante la maduración (Trieu-Cuot y Gripon, 1982). El hecho de que el péptido α_{S1} -I se encuentre en todos los tipos de quesos durante las primeras etapas de la maduración, incluso en aquellos en los que el cuajo es inactivo, se atribuye a la acción de la proteasa ácida de la leche, cuya especificidad hacia las caseínas es similar a la del cuajo (Kaminogawa y col., 1980).

II.7.3.2.3. Proteasas de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas ejercen una actividad endopeptidásica, fundamentalmente sobre la caseína β (Visser y de Groot-Mostert, 1977), aunque también actúan sobre la α_{S1} y su principal producto de degradación, el péptido α_{S1} -I (Desmazeaud y col., 1976), aunque esta actividad es poco significativa en relación con la del cuajo. En cuanto a los microorganismos no constituyentes del cultivo iniciador, los mohos del género *Penicillium*

ejercen una actividad intensa y liberan tanto péptidos de bajo peso molecular como aminoácidos (Desmazeaud y Zevaco, 1979). En quesos de pasta blanda, como el Brie o el Camembert, *Penicillium camemberti* produce dos endopeptidasas exocelulares que degradan profundamente las caseínas α_{s1} y β , alternándose su importancia a lo largo de la maduración (Trieu-Cuot y col., 1982 a y b). En el caso de los quesos azules, la acción de la proteasa ácida de *Penicillium roqueforti* es dominante, degradando fuertemente los péptidos, y liberando elevadas cantidades de aminoácidos que se encuentran en la pasta de estos quesos.

II.7.4. DEGRADACION DE LAS PROTEINAS DEL QUESO

La degradación de las principales cadenas polipeptídicas que originan péptidos de tamaño molecular intermedio y alto, se conoce como proteólisis primaria (Grappin y col., 1985) y afecta fundamentalmente al desarrollo de la textura del queso. El conjunto de reacciones catalizadas por las exopeptidasas de los microorganismos que complementan la acción de las proteinasas, dando péptidos de cadena corta y aminoácidos (Rank y col., 1985), se denomina proteólisis secundaria. El metabolismo de los aminoácidos da lugar, mediante reacciones enzimáticas y químicas, a la aparición de sustancias aromáticas volátiles y sápidas no volátiles. En la Figura II.13., se esquematizan las transformaciones que sufren las caseínas durante la maduración del queso.

Numerosos investigadores han evaluado la proteólisis de las diferentes caseínas durante la maduración de los quesos (Calvo y col., 1992a; 1992b), observando que el nivel de las α_{s1} disminuye más del 80% durante las primeras 5 semanas de maduración, mientras que la hidrólisis de la caseína β es más lenta, lo que confirma las diferencias en la estabilidad de las caseínas α_s y β (Lau y col., 1991). Carretero y col. (1992) estudiando el efecto de la maduración en las proteínas del lactosuero del queso de cabra determinaron que la β -lactoglobulina no es sensible a la proteólisis mientras que la α -lactoalbúmina y la seroalbúmina se degradan durante la maduración.

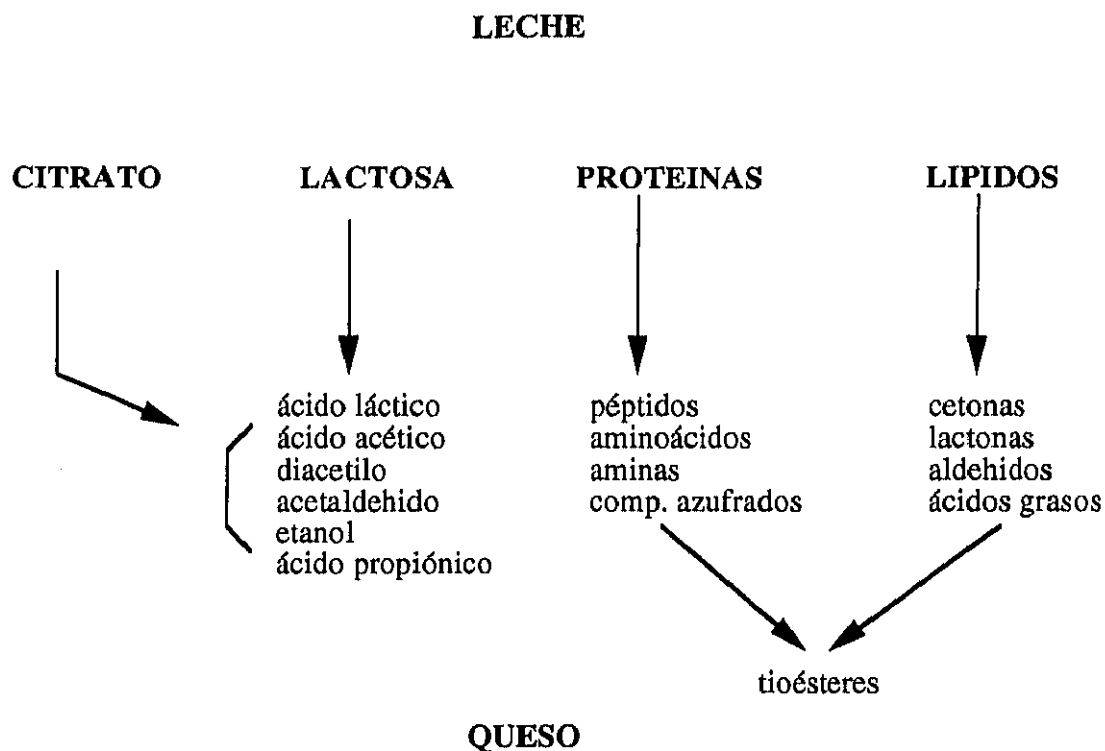


Figura II.12. Vías principales de formación del aroma y sabor del queso
(Law, 1984)

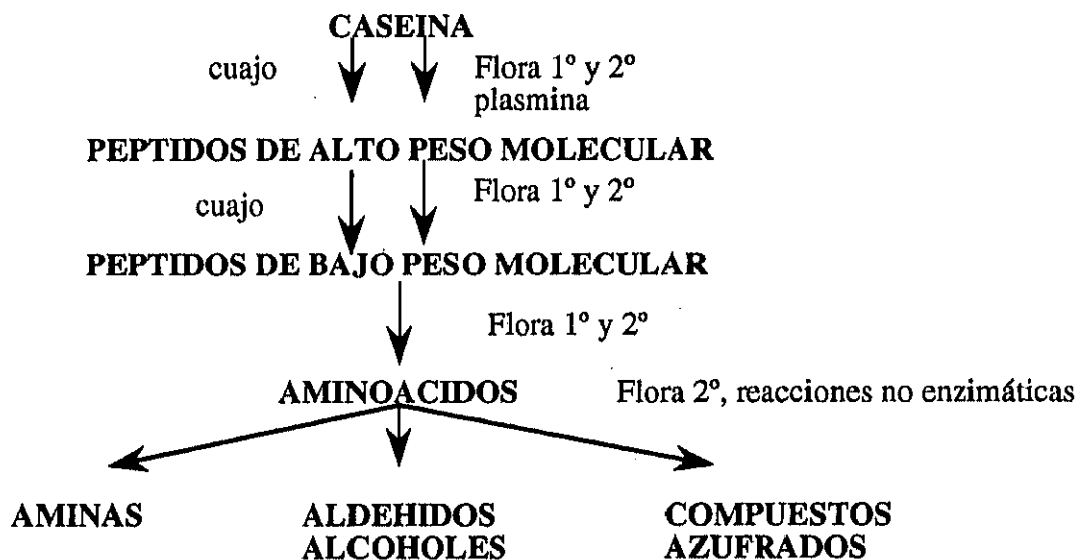


Figura II.13. Degradación de las caseínas durante la maduración del queso
(Law, 1987)

II.8. TECNICAS ANALITICAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR EL ORIGEN ESPECIFICO DE LA LECHE Y DERIVADOS LACTEOS

Para garantizar la calidad de la leche utilizada en la elaboración de quesos, cuya denominación de origen incluye como exigencia que la materia prima sea de las especies oveja, cabra o vaca, son necesarias técnicas analíticas precisas que permitan detectar bajos niveles de mezcla. En los últimos años, se han conseguido avances importantes en la metodología empleada para diferenciar mezclas de leche de diferentes especies, aunque queda mucho trabajo por realizar para disminuir los márgenes de error y lograr una mayor sensibilidad y rapidez de los ensayos. En este trabajo se revisarán algunos métodos empleados en la diferenciación de mezclas de leche de las especies vaca, oveja y cabra, mientras en la Tabla II.10., se resumen los métodos analíticos más recientes.

II.8.1. METODOS CROMATOGRAFICOS

Tradicionalmente, la cromatografía en capa fina y en fase gaseosa, han sido las técnicas más ampliamente utilizadas en el análisis de los componentes de la leche, fundamentalmente de la fracción lipídica. Actualmente el desarrollo espectacular de las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) han mejorado los resultados obtenidos. Los métodos cromatográficos presentan, frente a las técnicas electroforéticas, la ventaja de su posible utilización en los quesos muy madurados, ya que salvo en los quesos madurados con mohos, son escasas las modificaciones que experimenta la grasa durante el proceso de maduración (Ramos y col., 1977). Sin embargo, estos métodos carecen de utilidad cuando se emplea como adulterante la leche desnatada.

La cromatografía en fase gaseosa se ha utilizado para determinar los ácidos grasos de la grasa total o de las fracciones de mayor interés, así como una serie de relaciones porcentuales entre los diversos ácidos grasos (Benassi, 1963; Lotito y Cucurachi, 1967; Palo, 1975; Kuzdzal-Savoie y Kuzdzal, 1970; Ramos y col., 1977; Gattuso y Fazio, 1980; Smeyers-Verbeke y col., 1977). Iverson y Sheppard (1989), utilizando esta técnica han detectado la presencia de leche de vaca en mezclas con la de oveja o cabra, en proporciones próximas al 10%. El estudio de los triglicéridos por técnicas HPLC y el análisis de algunas fracciones por cromatografía en fase gaseosa han mostrado diferencias entre las leches de vaca, oveja y cabra (Barron y col., 1990), que quizá en un futuro podrían utilizarse en la identificación y cuantificación de estas mezclas.

Tabla II.10. Métodos Analíticos Empleados para Diferenciar Mezclas de Leche de Diferentes Especies Animales

METODOS ANALITICOS	VENTAJAS	INCONVENIENTES	FUENTES
CROMATOGRAFICOS			
Identificación de ácidos grasos	Detecta adulteraciones	Extracción de la grasa	Iverson y Sheppard (1989)
CLAE de triglicéridos	Posibilidad de automatización	Aún en desarrollo	Barron y col., (1990)
CLAE de caseínas	Rápido. Posible automatización	Proteolisis afecta al límite de detección	Haasnoot y col., (1986)
CLAE de proteínas del suero	Separación en pocos minutos	Sensible a tratamientos térmicos	Frutos y col., (1991)
ELECTROFORETICOS			
IEF de para- κ -caseínas	Detección mezclas de leche de vaca, oveja y cabra	Errores con proteolisis	Addeo y col., (1986)
IEF de γ -caseínas después del tratamiento con plasmina	No se afecta por proteolisis	Requiere tratamiento térmico	Krause y Belitz (1985)

Tabla II.10. : Continuación

METODOS ANALITICOS	VENTAJAS	INCONVENIENTES	FUENTES
Electroforesis e IEF de proteínas del suero	No se afecta por proteolisis	Sensibilidad al tratamiento térmico	Amigo y col., (1986)
INMUNOLOGICOS			
Inmunodifusión radial	Procedimiento sencillo	Sensible al tratamiento térmico	Levieux (1978)
Immunolectroforesis cruzada de β -caseínas.	Sensible y específico. No se afecta por tratamiento térmico	Menos sensibilidad en quesos azules	Elbertzhagen y Wenzel (1987)
Immunodotting (antisuero anti-caseínas)	Sensible. No se afecta por tratamiento térmico	Método semicuantitativo	Aranda y col., (1988)
ELISA (anticuerpos policlonales anti-caseínas)	Sensible y específico	Disponibilidad de reactivos comerciales	Rodríguez y col., (1990)

CLAE: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

IEF: Isoelectroenfoque

Fuente: Rodríguez y Juárez, 1995

Aunque en el campo de las proteínas en general y de las lácteas en particular, la cromatografía de filtración en geles y la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa se han utilizado ampliamente para aislar y fraccionar proteínas, estas técnicas no se han utilizado en la identificación del origen de la leche. Sin embargo, durante la última década la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha destacado por su facilidad, rapidez y exactitud en el análisis de muchos componentes orgánicos. Por ello, Kaiser y Krause (1985) utilizando la técnica de HPLC en fase reversa demostraron que los cromatogramas de los péptidos tripticos (derivados de la acción de la tripsina sobre la caseína) eran diferentes en los quesos de vaca, cabra, oveja y búfala, indicando que con este método se detecta la adición de un 1% de leche de vaca en quesos de cabra, aunque en su estudio no se hace referencia a la maduración de los quesos empleados.

Hasnoot y col. (1986) utilizando también técnicas de HPLC detectaron un 2-4% de leche de vaca en quesos de oveja y cabra, empleando como indicador de las mezclas lácteas la caseína α_{S1} bovina y en el caso de quesos madurados, el péptido α_{S1} -I, aunque en este caso el índice de detección fue del 10%. Frutos y col. (1991), han utilizado la técnica de HPLC en fase reversa para separar las proteínas del suero de la leche de vaca, oveja y cabra; la identificación y cuantificación de las β -lactoglobulinas permitió identificar adiciones del 2% en un tiempo muy corto. Kaminarides y Anifantakis (1993) utilizando la técnica de HPLC con columnas de intercambio aniónico, realizaron un estudio comparativo de la separación de las caseínas de las leches de vaca, oveja y cabra, indicando que la elución de la caseína α_{S1} bovina sucede más tarde que la de sus homólogas ovina y caprina bajo las mismas condiciones cromatográficas, por lo que la cantidad de leche de vaca adicionada en las de oveja y cabra podría calcularse determinando el área de la fracción cromatográfica de la caseína α_{S1} bovina, utilizando una curva standar.

II.8.2. METODOS ELECTROFORETICOS

De los métodos físico-químicos utilizados en la detección de mezclas de leche de diferentes especies, las técnicas electroforéticas pueden considerarse las más adecuadas, ya que presentan límites de sensibilidad comparables a los de los métodos biológicos y no requieren reactivos especiales, aunque como contrapartida deben utilizarse equipos sofisticados. Los métodos electroforéticos se han utilizado tanto para la separación de las caseínas, como para las proteínas séricas.

La separación de las caseínas por técnicas electroforéticas es la técnica más recomendable ya que esta fracción no se afecta por los tratamientos térmicos. De esta

manera, Aschaffenburg y Dance (1968) por electroforesis de las caseínas en geles de poliacrilamida observaron que la caseína α_{s1} bovina presentaba mayor movilidad que sus homólogas ovina y caprina y utilizaron esta mayor movilidad para detectar la presencia de niveles próximos al 2% de leche de vaca en mezclas con las de oveja y cabra. lo que ha dado lugar a la realización de otros estudios con el mismo fin (Pierre y Portmann, 1970; Ramos y col., 1985). En España esta técnica se utiliza como método oficial en la detección de leche de vaca en mezclas con leche de oveja, teniendo como límite de detección un 2% (B.O.E., 30/X/1991, Figura II.14.). Sin embargo, esta técnica no es válida para el análisis de mezclas en quesos madurados, ya que la degradación de las caseínas como consecuencia de la proteólisis que tiene lugar durante la maduración del queso, hace que la sensibilidad del método disminuya y la interpretación de los resultados cuantitativos sea más difícil.

El estudio de las proteínas del suero por electroforesis en geles de poliacrilamida tiene la ventaja de que estas proteínas no se degradan durante la maduración del queso, aunque tiene el inconveniente de que pueden verse afectadas por el tratamiento térmico. Amigo y col. (1986; 1989) se han basado en la diferente movilidad electroforética de las β -lactoglobulinas bovina, ovina y caprina en geles de poliacrilamida, para detectar mezclas del 1-2% en los quesos madurados. La β -lactoglobulina bovina posee mayor movilidad electroforética que la α -lactoalbúmina y las β -lactoglobulinas ovina y caprina. Los mismos autores (Amigo y col., 1991), también han evaluado el efecto de distintos parámetros tecnológicos sobre la detección de la leche de vaca utilizando el procedimiento citado; el método es válido para la detección y cuantificación del 1% de leche de vaca en quesos, incluso empleando como agente coagulante cuajo vegetal. Durante la fabricación industrial del queso, la leche se somete a temperaturas de pasteurización y este tratamiento puede desnaturalizar las proteínas del suero, lo que puede alterar los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la leche de vaca. Calvo y col. (1989), han evaluado el efecto del tratamiento térmico en los quesos; determinando que temperaturas de 90°C durante 30 segundos no afectan a la determinación de leche de vaca en leche de oveja o cabra por este método.

La electroforesis de las proteínas séricas en geles de poliacrilamida es el método oficial en España para la determinación de la leche de vaca en la de oveja o cabra y para la determinación de leche de cabra en la de oveja (la β -lactoglobulina caprina presenta una menor movilidad electroforética que la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina ovina), siendo en ambos casos el límite de detección del 2%. También es un método oficial para la detección de la leche de vaca en el queso de oveja o cabra y para la detección de la leche de cabra en el queso de oveja, teniendo como límite de detección un 3% (B.O.E., 30/X/91,

Figura II.15.).

En los últimos años, la técnica del isoelectroenfoque (IEF) ha reemplazado a la de la electroforesis en geles de poliacrilamida. El IEF consiste en una electroforesis en un gradiente de pH (3,5-9,5) con un gran poder de resolución y en la que los componentes se separan por diferencias en su punto isoelectrico. Addeo y col. (1986) basándose en las diferencias en la secuencia de las para- κ -caseínas bovina, caprina y ovina, y utilizando la técnica del isoelectroenfoque han detectado la presencia simultánea de leche de vaca, oveja y cabra, en mezclas lácteas y quesos madurados en concentraciones próximas al 0,5%, utilizando nitrato de plata como reactivo de tinción. En general este método es válido para el control, tanto de la leche como del queso madurado; sin embargo, si se intenta comprobar la genuinidad de un queso muy proteolizado, como el de Roquefort, pueden obtenerse resultados erróneos por sobreestimación, ya que algunos péptidos formados durante la maduración pueden tener el mismo punto isoelectrico que la para- κ -caseína bovina (Addeo y col., 1989a y b). Krause y Belitz (1985), han descrito la detección de porcentajes del 1-2% de leche de vaca en mezclas de oveja y cabra por electroforesis de las caseínas γ_2 . Sin embargo, en los quesos madurados los péptidos formados con el mismo punto isoelectrico de la caseína bovina γ_2 , pueden interferir en su determinación. Esto puede resolverse con el tratamiento del queso, previo al análisis, con plasmina bovina, lo que origina la hidrólisis de las caseínas γ y permite una mejor separación de las caseínas bovinas γ_2 de los péptidos descritos. El método también es válido en la identificación de mezclas de leche de vaca y búfala, en el queso Mozzarella (Addeo y col., 1989b). El procedimiento mejora en su sensibilidad y tiempo de análisis utilizando geles ultrafinos, preparados comercialmente y realizando la electroforesis y tinción de los geles en un equipo "Phast-System" (Pharmacia). Este método ha sido recomendado recientemente por la CEE como método de referencia en la detección de caseínas de la leche de vaca en quesos de oveja (Diario de las Comunidades Europeas, N° 174/23-32 de 20/3/1992).

La técnica del IEF también se ha utilizado en el análisis de las fracciones séricas de la leche. Ruiz y Santillana (1986) utilizando geles de poliacrilamida con un gradiente de pH de 3,5-9,5 consiguen un límite de detección de un 3% de leche de vaca o cabra en la de oveja, utilizando las prtoteínas séricas como las indicadoras de la sustitución. Con este mismo método Rispoli y col. (1991), concluyen que la determinación cualitativa y cuantitativa de la leche de vaca es aplicable en quesos muy proteolizados, como el de Roquefort. Moio y col. (1990) proponen la utilización geles pequeños de poliacrilamida con urea y el sistema "Phast-System", como un método rápido de detección de leche de vaca en la leche o quesos de oveja, cabra y búfala o quesos. Ortín y col. (1992a) analizando por IEF las proteínas

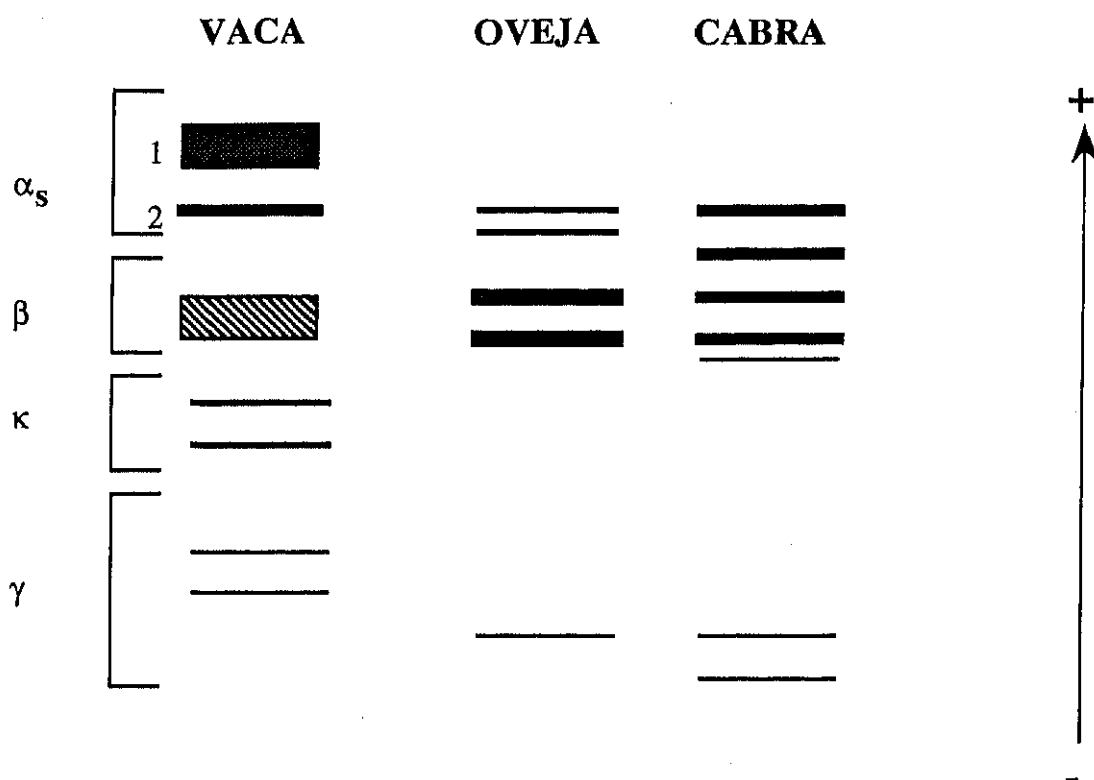


Figura II.14. Separación de las caseínas de la leche por electroforesis en geles de poliacrilamida

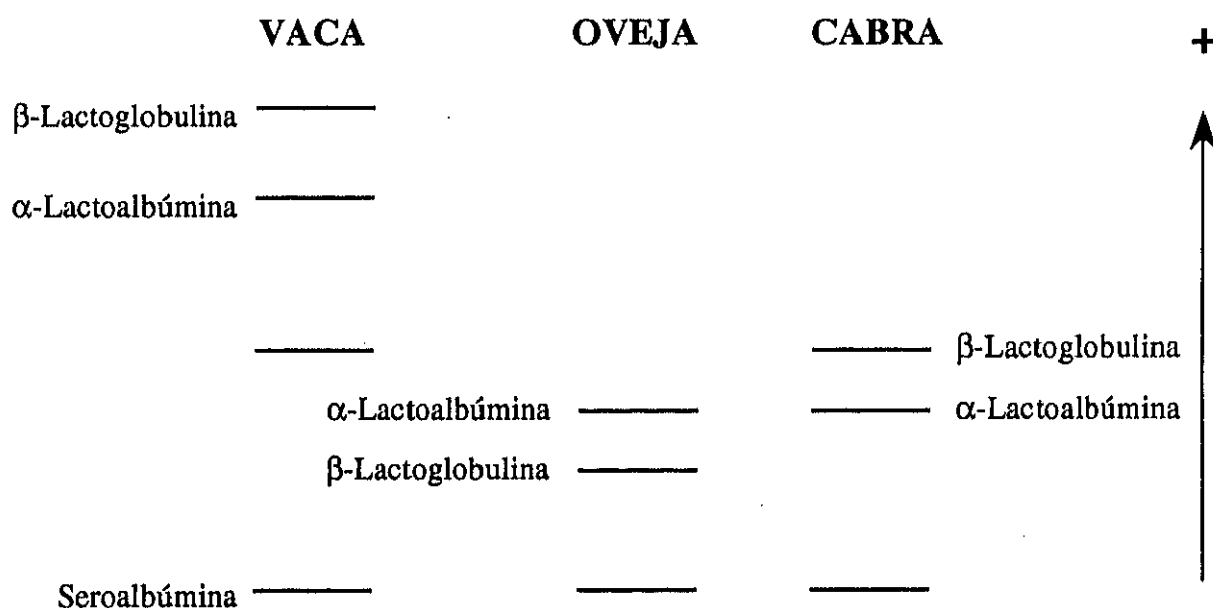


Figura II.15. Separación de las proteínas del lactosuero por electroforesis en geles de poliacrilamida

séricas de quesos con mezclas de leche de vaca, oveja y cabra, determinan porcentajes de sustitución del 5-40% con una gran precisión. Estos autores describen que en los quesos frescos y de corta maduración, fabricados con mezclas de leche de oveja, cabra y vaca, la técnica del IEF en microgeles de poliacrilamida de capa muy fina (Phast-System), es un método analítico fácil y rápido, si bien los medios precisos son de coste elevado, con una resolución e identificación seguras de las proteínas séricas específicas presentes en las mezclas de leche. Los mismos autores (Ortín y col., 1992b), utilizan este método para determinar los puntos isoeléctricos de las caseínas κ de oveja, cabra y vaca y en la cuantificación de mezclas binarias y terciarias con las proteínas indicadoras teñidas con el nitrato de plata, concluyendo que, como las caseínas κ en los quesos se degradan a para- κ -caseínas y estas no se degradan durante la maduración del queso ni se afectan por el tratamiento térmico, representan un marcador potencial de las mezclas de leches en los quesos, considerando aceptables los resultados obtenidos.

De lo expuesto es posible concluir, que del estudio de las para- κ -caseínas o las caseínas γ por IEF, o del estudio de las β -lactoglobulinas por electroforesis en geles de poliacrilamida o IEF, utilizando nitrato de plata como reactivo de tinción, permite detectar niveles muy bajos de leche de las especies vaca, oveja y cabra en mezclas lácteas y quesos madurados.

II.8.3. METODOS INMUNOLOGICOS

La investigación y desarrollo de las técnicas inmunológicas como técnicas analíticas comenzó hace aproximadamente 25 años, empleándose sobre todo en el diagnóstico clínico para el análisis de hormonas, medicamentos y marcadores tumorales (Rittenburg, 1990). En la última década (8-10 años), se han utilizado con éxito en la industria alimentaria en la detección y cuantificación de antibióticos, pesticidas, microorganismos, micotoxinas, hormonas, adulterantes y componentes naturales de los alimentos (Samarajeewa y col., 1991; Gazzaz y col., 1992), aunque su mayor desarrollo se ha producido durante los últimos cinco años. Estas técnicas poseen frente a otras técnicas físico-químicas o biológicas, las ventajas de su sensibilidad, bajo coste, especificidad, rapidez y la ausencia de equipos instrumentales complejos (Rodríguez y Juárez, 1995). Además, la disponibilidad de "kits" comerciales ahorra tiempo y elimina la necesidad de analizar las muestras en laboratorios sofisticados (Allen, 1990; Samarajeewa y col., 1991), por lo que se diferencian de otras técnicas en que su tecnología reside en las moléculas y no en los equipos de detección utilizados.

Todos los métodos inmunológicos pretenden la visualización objetiva de la interacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. Por antígeno se entiende toda sustancia a la que se une un anticuerpo específico en los lugares reactivos de la molécula antigénica, denominados epítopos. El término inmunogenicidad se refiere a la capacidad de un antígeno para inducir la formación de anticuerpos, lo que depende entre otros factores de su peso molecular, su composición química y su capacidad para ser reconocido como extraño por el organismo receptor. Un buen inmunógeno deberá tener al menos 3.000-5.000 daltons para inducir una buena respuesta inmune mientras las sustancias con menos de 1000 daltons (haptenos), pueden convertirse en inmunógenas si se conjugan previamente a moléculas vehiculadoras (carriers).

Los anticuerpos que utilizados en las técnicas inmunológicas son de dos tipos: policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales se obtienen de ratones, conejos, ovejas, cabras o caballos, mientras los monoclonales se obtienen de ratones. La especificidad de un inmunoensayo depende, en gran medida, del tipo de anticuerpo utilizado (Hefle, 1995). En la Tabla II.11. se comparan algunas características asociadas a la obtención de ambos tipos de anticuerpos.

Para la obtención de anticuerpos policlonales, los animales se inmunizan periódicamente con los antígenos de interés (Figura II.16.). Las inmunoglobulinas resultantes se detectan en la sangre, aproximadamente una o dos semanas después de la primera inyección, mientras la concentración de anticuerpos en el suero puede llegar a superar la de 1 mg/ml. Cuando el animal alcanza el título de anticuerpos deseado, se obtiene el suero sanguíneo. Una preparación de anticuerpos policlonales puede contener hasta 50 proteínas diferentes, además de las de interés por lo que para obtener inmunosueros con una concentración elevada de inmunoglobulinas específicas, éstos deben purificarse por técnicas de precipitación selectiva o por cromatografía de afinidad (Hefle, 1995; Gazzaz y col., 1992).

El ratón es el animal de elección en la obtención de anticuerpos monoclonales y desde que en 1975 Köhler y Milstein desarrollaran la metodología para su obtención, se han utilizado con éxito en los inmunoensayos. Los ratones se inmunizan con el antígeno de interés y cuando se detecta un título suficiente de anticuerpos policlonales en el suero, el animal se sacrifica. Los linfocitos se aíslan del bazo y se fusionan con células inmortales o mielomas que crecen indefinidamente como cultivos celulares. Las células resultantes de la fusión denominadas hibridomas, adquieren la capacidad de sobrevivir "in vitro" de la célula de mieloma y la de producir anticuerpos específicos del linfocito hiperinmune. Cuando los hibridomas crecen como cultivos celulares los anticuerpos se secretan al medio de cultivo

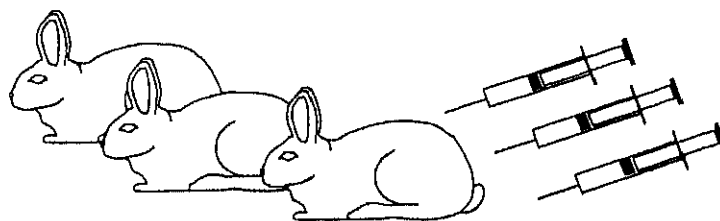
Tabla II.11. Características de Interés de la Producción de Anticuerpos Monoclonales y Policlonales

CRITERIO	MONOCLONALES	POLICLONALES
<u>Pureza del Antígeno</u>	No es significativa	Significativa
<u>Costes</u>	Inicialmente altos	Bajos
<u>Tiempo necesario</u>	2-3 meses	1-2 meses
<u>Concentración</u>	1- 25 µg/ml ^a 0,5-5 mg/ml ^b	> 1 mg/ml
<u>Reactividad cruzada</u>	Ninguna	Alguna
<u>Afinidad</u>	Homogéneos	Heterogéneos

a. Sobrenadante de los hibridomas cultivados

b. Líquido ascítico

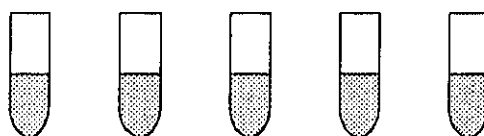
Fuente: Hefle, 1995



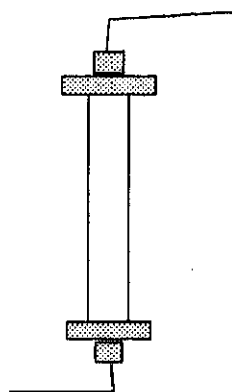
**Inmunización del animal con
la mezcla antígeno-adyuvante**



Inyecciones repetidas



Obtención del suero del animal



Purificación de las Inmunoglobulinas del suero

Figura II.16. Producción de anticuerpos policlonales

mientras que cuando se inoculan en la cavidad peritoneal de los ratones inducen la producción de líquido ascítico (Figura II.17.). Debido a que una célula híbrida procede de una célula de bazo que secreta un único tipo de inmunoglobulinas, los anticuerpos monoclonales son químicamente idénticos y homogéneos en su estructura y especificidad, por lo que por su pureza y su fácil obtención son idóneos para su utilizarlos en los inmunoensayos (Hefle, 1995). Los hibridomas pueden almacenarse en nitrógeno líquido en congelación a -85° durante largos períodos de tiempo y recuperarlas más tarde para producir anticuerpos (producción ilimitada de anticuerpos).

Los adyuvantes son preparaciones que incrementan la inmunogenicidad de los antígenos y se utilizan tanto en la producción de anticuerpos policlonales como monoclonales, siendo estimuladores no específicos de la respuesta inmune y la mayoría forman un depósito que protege al antígeno de un rápido metabolismo y destrucción, permitiendo la utilización de pequeñas cantidades de inmunógeno. El más utilizado es el adyuvante de Freund's que consiste en una emulsión agua-aceite que contiene células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* y como ingrediente activo un péptido de su pared celular que estimula el sistema inmune del animal inespecíficamente. Otros adyuvantes utilizados son las sales de aluminio, polímeros no iónicos, péptidos poliméricos y otros (Hefle, 1995).

Las técnicas inmunológicas basadas en las reacciones de precipitación entre proteínas del suero, y anticuerpos específicos se han utilizado ampliamente en la identificación de la especie animal de la leche en mezclas lácteas y quesos madurados (Ramos y Juárez, 1986; García, 1991; Rodríguez, 1992), por lo que en este trabajo se describirán escuetamente para centrarnos, posteriormente, en el desarrollo y utilización de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que por ser más recientes y eficaces y por constituir un soporte experimental fundamental en el desarrollo de este trabajo investigador, merecen una mención especial.

II.8.3.1. TECNICAS CLASICAS

La Inmunoprecipitación en Medio Líquido desarrollada por Pinto (1966) fue la primera técnica inmunológica empleada en la detección de leches de diversas especies animales en mezclas lácteas, siendo eficaz en las leches crudas y pasteurizadas, pero no en las leches esterilizadas, en polvo y condensadas, donde no es posible observar la reacción de precipitación, ya que los precipitados son poco aparentes y desaparecen rápidamente una vez formados.

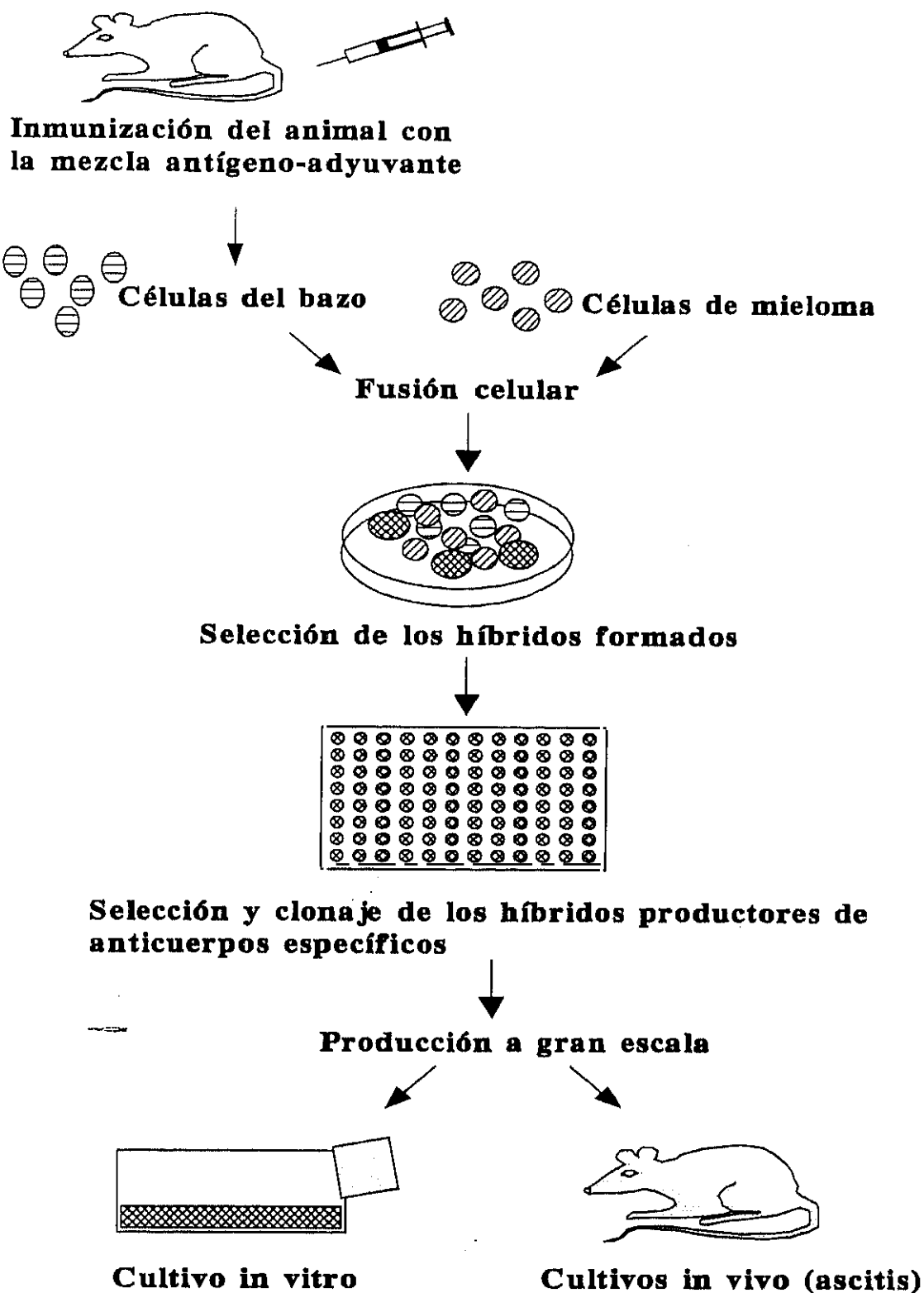


Figura II.17. Producción de anticuerpos monoclonales

En 1974, Durand y col. utilizando la técnica de Inmunodifusión Doble en geles de agarosa, consiguieron detectar un 2,5% de leche de vaca en la de cabra y oveja. Este método sencillo tiene el inconveniente de que es semicuantitativo, aunque la proteólisis del queso no influye en el resultado siendo un método todavía empleado en las queserías. Actualmente, los inmunosueros se obtienen comercializados, siendo utilizados por algunos investigadores en diferentes tipos de queso (Ramos y Juárez, 1986). Utilizando esta técnica, Gombocz y col. (1981a) detectaron hasta un 5% de leche de vaca en la de oveja.

En nuestro Departamento, García y col. (1989) han desarrollado un test (COMIT) para la identificación de leche de vaca (3-100%) en la de oveja. El ensayo utiliza anticuerpos policlonales frente a las proteínas séricas de la leche de vaca. La diferencia más significativa con las técnicas de inmunodifusión convencionales, radica en que los reactivos utilizados se distribuyen embebidos en discos de papel de filtro liofilizados, lo que permite la difusión de su contenido por el gel. Además, los geles poseen un colorante y una concentración adecuada de polietilenglicol, lo que permite una mejor visualización de las líneas de precipitación Antígeno/Anticuerpo.

En España la técnica de Inmunodifusión Radial, desarrollada por Levieux (1977), es una técnica oficial en la detección de leche de vaca en mezclas lácteas y de leche de cabra en leche de oveja, siendo su límite de detección del 1% (B.O.E., 30/X/1991), utilizándose en la leche cruda o la pasteurizada a 74°C, durante 30 minutos, aunque algunos investigadores también la han utilizado en la identificación de mezclas lácteas en quesos madurados (Barbosa y Gonçalves, 1985; Amigo y col., 1989). Calvo y col. (1989) evaluando el efecto de los tratamientos térmicos en la determinación de la leche de vaca en mezclas con la de oveja y cabra, determinaron que, temperaturas de pasteurización (74°C, 30 segundos) no afectan la determinación cuantitativa de las proteínas séricas utilizando el método electroforético o el de inmunodifusión, mientras el calentamiento de la leche a temperaturas de 90°C durante 30 segundos, sólo permite la detección de leche de vaca con el método electroforético. Amigo y col. (1989), comparando el método electroforético en geles de poliacrilamida con el de la inmunodifusión radial en la detección de las leches de vaca y cabra en quesos madurados, determinaron que el método electroforético era más fiable. Los mismos autores (Amigo y col., 1992), comparando el método electroforético, el de isoelectroenfoque y el de la inmunodifusión en la detección de leche de vaca y cabra en el queso Serra de Estrela, concluyeron que los resultados obtenidos por electroforesis e isoelectroenfoque eran similares, mientras que, con la inmunodifusión se obtenían falsos negativos.

Utilizando la técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación, Levieux (1980), consigue detectar hasta un 1% de leche de vaca en la de cabra. La combinación de las técnicas electroforéticas con las inmunológicas ha dado lugar a las técnicas de Inmunoelectroforesis en Cohete e Inmunoelectroforesis Cruzada. La primera de ellas fue utilizada por Radford y col. (1981) en la detección de un 1-5% de leche de vaca en leche de cabra y, la segunda, por Elbertzhagen y Wenzel (1982, 1987) que detectaron un 0,1-0,2% de leche de vaca en quesos de oveja o cabra, utilizando un inmunosuero frente a las caseínas y proteínas del suero de la leche de vaca. Krause y col. (1988), utilizando esta misma técnica e inmunosueros anticaseínas de la leche de vaca, han detectado un 0,1-0,2% de leche de vaca en leche y quesos de oveja y cabra, señalando, que ni la maduración de los quesos ni los tratamientos térmicos modifican la sensibilidad del método.

Bernhauer y col. (1983) utilizando la técnica de Electrosinéresis han detectado un 0,1-1% de leche de vaca en la de cabra y oveja y un 0,1-2% de la misma leche en los quesos madurados. No obstante, la sensibilidad del método varía cuando la leche se somete a tratamientos térmicos mayores que la pasteurización y cuando en la maduración de los quesos se produce una proteólisis intensa.

II.8.3.2. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA)

Los inconvenientes asociados a la utilización de las técnicas descritas, es que requieren mucho tiempo o una gran cantidad de anticuerpos purificados y que la mayoría son sólo cualitativas o semicuantitativas. El desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) ha supuesto una alternativa interesante a los métodos convencionales utilizados en la identificación de leche de diversas especies animales, debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez.

La utilización en las técnicas inmunológicas de marcadores que se conjugan a uno de los componentes de la reacción, permite detectar y cuantificar los complejos antígeno-anticuerpo formados. Estos marcadores pueden ser radioisótopos, enzimas, moléculas fluorescentes o luminiscentes y bacteriófagos (Gazzaz y col., 1992). Las técnicas más utilizadas son el radioinmunoensayo (RIA) y el enzimoimmunoensayo, siendo Yalow y Berson (1959) los primeros que describieron un método de RIA para la detección de la insulina; sin embargo, debido a los inconvenientes asociados a la utilización de marcadores radioactivos, éstos se sustituyeron por enzimas iniciando el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas (Engvall y Perlmann, 1971; Van Weemun y Schuurs, 1971).

Los enzimoimmunoensayos pueden ser de dos tipos: homogéneos y heterogéneos. En los homogéneos, la actividad del marcador enzimático está modulada por la interacción antígeno-anticuerpo y no se requiere la separación de los reactivos, aunque este tipo de ensayos no se utilizan normalmente en el análisis de alimentos. Los heterogéneos requieren la separación de los complejos antígeno-anticuerpo de los componentes libres y la inmovilización de uno de los componentes de la reacción a una fase sólida, lo que facilita la separación de los componentes libres. La mayoría de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizadas en el análisis de los alimentos son heterogéneas.

En las técnicas ELISA el antígeno o el anticuerpo se fijan a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado (Clark y Engvall, 1980). En algunas aplicaciones, como fase sólida se utilizan membranas, generalmente de nitrocelulosa a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos, denominándose este tipo de ensayo como "Inmunodotting". A diferencia de esta técnica, la del "Inmunoblotting", es una técnica que combina la separación previa de las proteínas por electroforesis y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa, en la que los antígenos de interés se identifican por un ELISA.

En cuanto al enzima utilizado en la conjugación al antígeno o anticuerpo es conveniente que esté purificado, que sea activo, fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente observable y cuantificable. Los enzimas más utilizados con este fin son la peroxidasa de rábano, la β -galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina (Voller y col., 1986).

La elección del sustrato del enzima es también importante en las metodologías ELISA. El sustrato debe ser estable y soluble, antes y después de su degradación. El enzima peroxidasa de rábano, uno de los más empleados, utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno y como donantes de hidrógeno la O-fenildiamina (OPD), el ácido 2, 2'-azino-di (3-etil-benzotiazolina) sulfónico (ABTS), el ácido 5-aminosalicílico y la 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. En el caso de la β -galactosidasa, el sustrato más utilizado es el o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (O-NPG) y para la fosfatasa alcalina el p-nitrofenil (P-NPP) (Tyssen, 1985). Los compuestos donantes de hidrógeno, al oxidarse en presencia del sustrato, originan compuestos coloreados cuantificables espectrofotométricamente.

II.8.3.2.1. Inmunodotting

Se trata de una técnica inmunoenzimática que visualiza las interacciones Ag/Ac en un papel de nitrocelulosa. El antígeno se absorbe en este soporte y se pone en contacto con el anticuerpo; en caso de correspondencia, los anticuerpos unidos al antígeno se detectan con un segundo anticuerpo obtenido frente al anterior y conjugado con un enzima. La reacción se visualiza al añadir el sustrato del enzima, por lo que en el papel de nitrocelulosa se desarrollan manchas coloreadas de intensidad variable.

Aranda y col. (1988) utilizando esta técnica y un inmunosuero anti-caseínas de la leche de vaca detectan un 0,1% de leche de vaca en la de oveja. Este método también se ha utilizado en los quesos, aunque los resultados son sólo semicuantitativos. García (1990) empleando esta técnica y un inmunosuero anti-proteínas séricas de la leche de vaca, consiguen la detección de un 3% de leche de vaca en la de oveja. Calvo y col. (1989) han utilizado también el inmunodotting y anticuerpos policlonales frente a las caseínas bovinas o frente a las inmunoglobulinas de especie, para detectar la presencia de leche de vaca en la de oveja con índices de detección del 0,1%. Recientemente, Aranda y col. (1993) han utilizado este método para detectar la presencia de leche de cabra o vaca en leches y quesos de oveja.

II.8.3.2.2. Immunoblotting

Esta técnica combina la electroforesis con las técnicas inmunoenzimáticas, basándose en la transferencia electroforética de las proteínas separadas por electroforesis a una membrana sintética, donde los antígenos de interés se detectan por un ELISA Indirecto.

Moio y col. (1992) combinando la técnica del isoelectroenfoco con un inmunoblotting en Phast-System y utilizando anticuerpos policlonales frente a la β -caseína bovina, consiguen la detección de un 5% de leche de vaca en quesos Roquefort de 10 días a 5 meses de maduración.

II.8.3.2.3. Técnicas ELISA

El ELISA es el método inmunológico más ampliamente utilizado en el análisis de los alimentos debido a su bajo coste y rapidez, facilidad de utilización y posible automatización, permitiendo el análisis de un gran número de muestras en un corto espacio de tiempo (Allen, 1990). Dichas técnicas se basan en la fijación del antígeno o del anticuerpo en un soporte sólido y en la visualización objetiva de la interacción antígeno-anticuerpo mediante

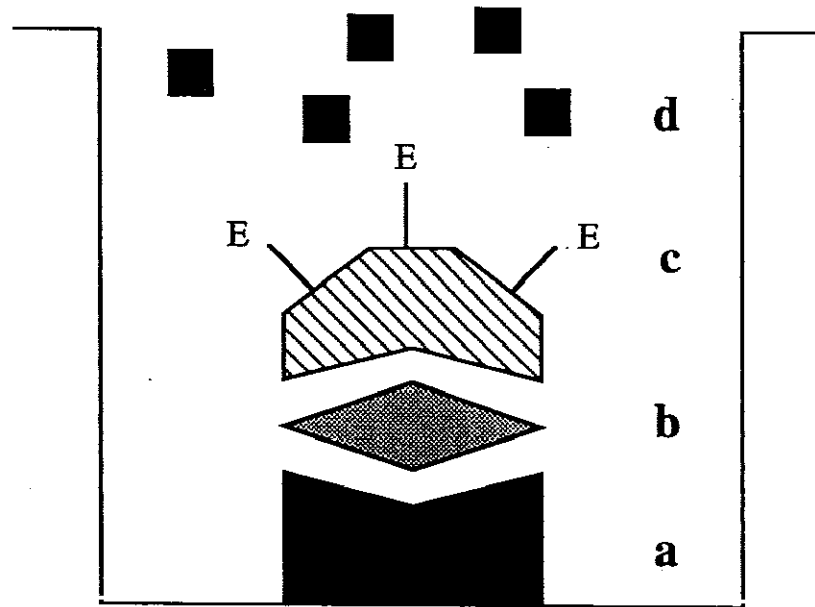
la conjugación de uno de los componentes de la reacción con un enzima. Los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) permiten el diseño de diversas variantes metodológicas, de las que las más utilizadas son el ELISA indirecto, sandwich y competitivo.

En la técnica del ELISA Indirecto (Figura II.18.), el antígeno se fija por adsorción pasiva a una superficie inerte (a); a continuación se adicionan los anticuerpos específicos, que reconocen al antígeno (b) y se unen a él formando un complejo que se detecta mediante la incorporación de un segundo anticuerpo marcado con un enzima (c). La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato (d), libera un compuesto coloreado. Una consideración importante acerca de este formato es que durante la fijación del antígeno por adsorción pasiva a la placa, éste puede sufrir cambios estructurales que si afectan a los epítopos pueden hacerles irreconocibles para los anticuerpos (Hefle, 1995)

En la técnica del ELISA Sandwich (Figura II.19.), el anticuerpo específico (anticuerpo de captura) se fija a una fase sólida (a1) y a continuación se añade el antígeno problema, el cual es capturado por el anticuerpo fijado (b). El complejo anticuerpo-antígeno se detecta generalmente con el mismo anticuerpo marcado con un enzima (c) (anticuerpo de detección). Finalmente, se añade el sustrato (d) y el compuesto coloreado liberado por el enzima, permite visualizar la reacción. Como anticuerpos de captura y de detección puede utilizarse el mismo anticuerpo o dos tipos diferentes de anticuerpos, como uno policlonal y otro monoclonal. Esta última combinación incrementa la sensibilidad del ensayo ya que el policlonal reconoce epítopos diferentes en el mismo antígeno.

El ELISA Competitivo puede ser directo (cuando se mide la cantidad de anticuerpo) o indirecto (si se mide el antígeno), siendo este último es el más utilizado en los alimentos. En la técnica del ELISA Competitivo (Figura II.20.), el anticuerpo (directo) o el antígeno específico (indirecto) se fija a una superficie inerte (1), y, a continuación, se añade el antígeno o el anticuerpo mezclado con la muestra problema, con un segundo anticuerpo marcado con un enzima (2a). Utilizando como control otro pocillo carente de muestra (2b) y tras adicionar el sustrato (3a y 3b), se observa la diferencia de color entre ambos pocillos, lo que refleja la concentración de antígeno de la muestra problema.

En los últimos años, se ha comprobado que el complejo avidina-biotina es un mediador muy útil y versátil en una gran variedad de aplicaciones analíticas, incluidas las técnicas inmunoenzimáticas (Wilchek y Bayer, 1988). Utilizando las propiedades de este complejoes posible amplificar las reacciones inmunoenzimáticas debido a la elevadísima afinidad (10^{15} M^{-1}) de la avidina por la biotina y a la gran estabilidad de la interacción no covalente. En el caso del ELISA Indirecto (Figura II.21.), después de fijar el antígeno a una



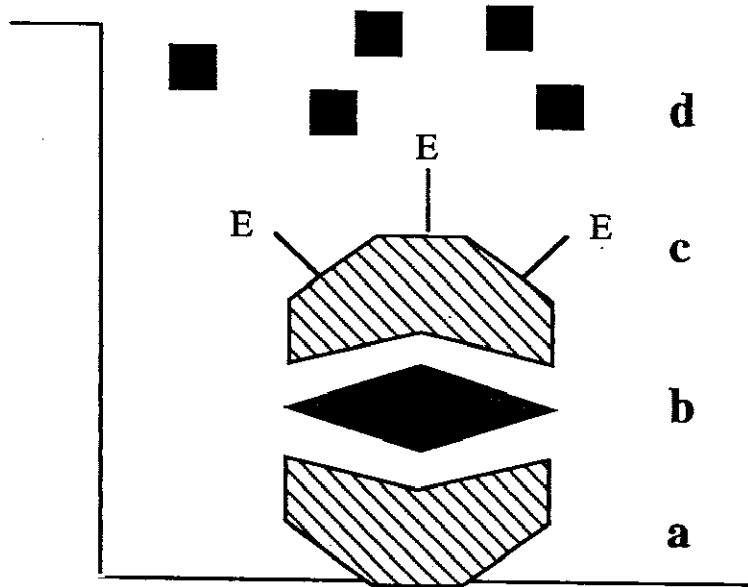
d. Adición del sustrato enzimático

c. Antiinmunoglobulinas conjugadas a un enzima y que reconocen el complejo antígeno-anticuerpo

b. Anticuerpos específicos que reconocen al antígeno

a. Antígeno adsorbido al pocillo

Figura II.18. Esquema de la técnica del ELISA Indirecto



d. Adición del sustrato enzimático

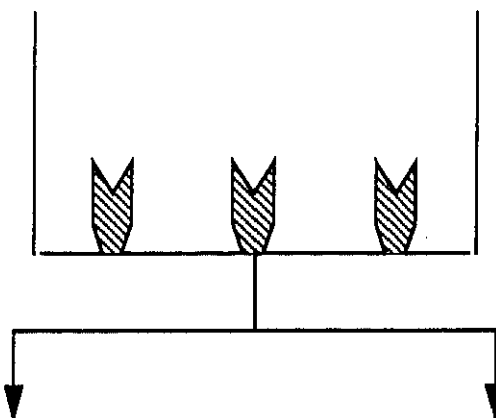
c. Anticuerpos específicos de detección marcados con un enzima y que reconocen al antígeno anclado

b. Antígeno capturado por un anticuerpo específico

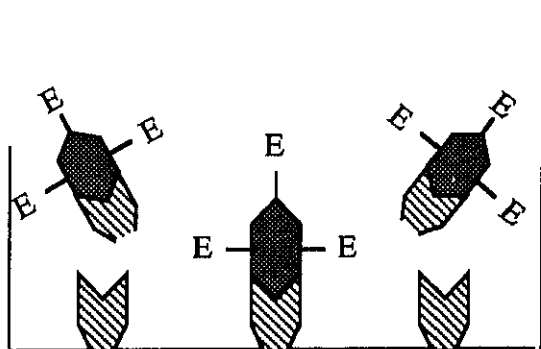
a. Anticuerpo de captura adsorbido al pocillo

Figura II.19. Esquema de la técnica del ELISA Sandwich

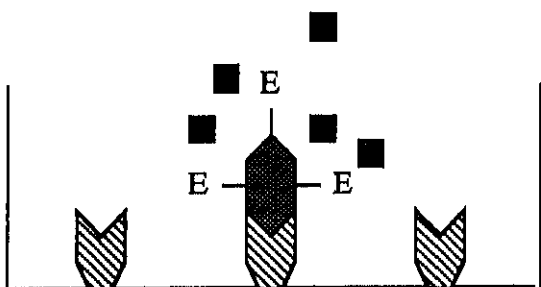
1. Antígeno adsorbido al pocillo



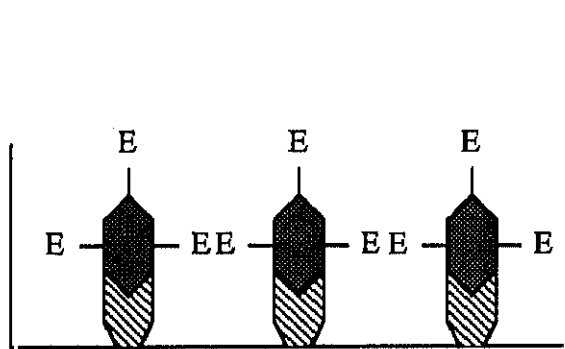
2a. Adición del conjugado anticuerpo-enzima y de la muestra problema



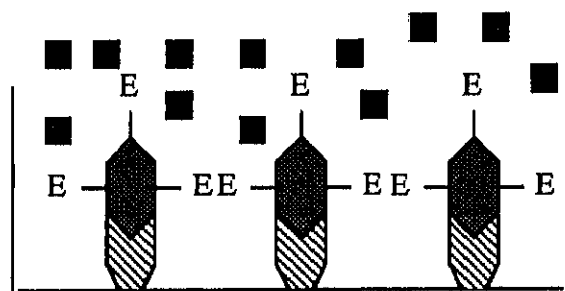
3a. Adición del sustrato enzimático



2b. Adición del conjugado anticuerpo-enzima (control)

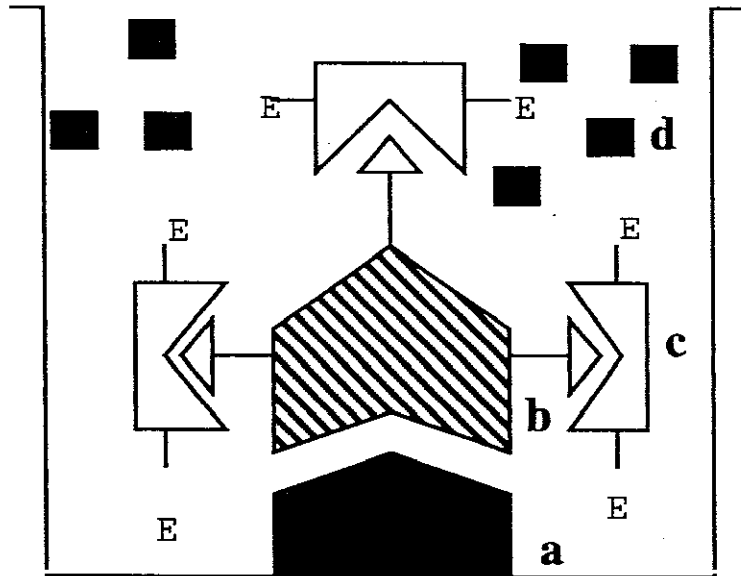


3b. Adición del sustrato enzimático



Lectura espectrofotométrica a 405 nm

Figura II.20. Esquema de la técnica del ELISA Competitivo



d. Adición del sustrato enzimático

c. Avidina marcada con un enzima, que reconoce a la biotina

b. Anticuerpos específicos conjugados a la biotina que reconocen al antígeno

a. Antígeno adsorbido al pocillo

Figura II.21. Esquema de la técnica del ELISA Indirecto, utilizando anticuerpos conjugados con biotina

superficie sólida (a), se añaden los anticuerpos específicos de la reacción conjugados con la biotina (b) y, a continuación, el complejo antígeno-anticuerpo se detecta con un conjugado de avidina-enzima (c), en lugar de las anti-inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo unido al enzima. La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato (d), libera un compuesto coloreado.

La mayoría de los métodos inmunoenzimáticos descritos en la identificación y cuantificación de la leche de diversas especies animales en mezclas lácteas y en quesos madurados, utilizan anticuerpos policlonales frente a las proteínas del suero de la leche (García y col., 1990; 1991) o frente a las caseínas totales (Rodríguez y col., 1990; 1993), inmunoglobulinas bovinas (Sauer y col., 1991) o péptidos sintéticos (Rolland y col., 1993; 1995). En nuestro Departamento, se posee una amplia experiencia en la obtención de reactivos y en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) en la diferenciación de la leche de diversas especies animales. Así, García (1990) utilizando un ELISA Indirecto y anticuerpos policlonales frente a las proteínas del suero de la leche de vaca, oveja y cabra, neutralizados o purificados por cromatografía de afinidad, detectó un 1% de leche de vaca y cabra en la de oveja, mientras con la técnica del ELISA Sandwich detectó y cuantificó el 1-30% de sustitución de leche de oveja por la de vaca y cabra.

Posteriormente, Rodríguez (1992), utilizando un ELISA Indirecto y anticuerpos policlonales frente a las caseínas totales bovinas, ovinas y caprinas, neutralizados o purificados por cromatografía de afinidad, detectó y cuantificó la presencia de un 1 al 50% de leche de vaca en las leches y quesos de oveja y cabra y la sustitución de un 1 al 25% de leche o queso de oveja por la de cabra. Asimismo, utilizando la técnica del ELISA Sandwich le fue posible detectar y cuantificar un 0,1 al 25 % de leche de vaca en las leches y quesos de oveja y cabra y del 1 al 100% de leche de cabra en las leches y quesos de oveja.

No obstante, algunos inconvenientes asociados a la utilización de anticuerpos policlonales radican en la disponibilidad limitada de los mismos y en la necesidad de purificarlos para eliminar reacciones cruzadas y que posean una especificidad adecuada. Además, la purificación de los inmunosueros por afinidad es larga y costosa y los anticuerpos purificados constituyen una mezcla de inmunoglobulinas que pueden variar en su afinidad por el antígeno, lo que representa un problema a largo plazo.

Recientemente, Rolland y col. (1993), han desarrollado un ELISA Competitivo utilizando anticuerpos policlonales frente a un péptido sintético del fragmento 140-149 de la caseína α_{S1} bovina, detectando y cuantificando del 0,125% al 64% de leche de vaca en

leche de oveja y del 0,5 al 15% en quesos. Dichos anticuerpos policlonales han mostrado también su utilidad en la detección de leche de vaca en la leche y los quesos de cabra (Rolland y col., 1995).

Así mismo, el desarrollo de la tecnología de la obtención de anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975), ha proporcionado el medio adecuado para la producción continuada de anticuerpos específicos de actividad biológica conocida y especificidad determinada, lo que ha permitido la obtención de anticuerpos monoclonales frente a las diferentes caseínas bovinas (Feng y Cunningham-Rundless, 1989; Kuzmanoff y col., 1990a, 1990b, 1991; Leung y col., 1991; Nagaune y col., 1988; Oudshoorn y col., 1994), pero que no se han utilizado en la identificación del origen de la leche de diversas especies animales. No obstante, Levieux y Venien (1994) han obtenido anticuerpos monoclonales frente a la β -lactoglobulina bovina y utilizando técnicas ELISA, han conseguido la detección de leche de vaca en leche de cabra u oveja en cantidades de 1 parte de leche de vaca/100.000 partes de leche de cabra u oveja.

En nuestro Departamento se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a la caseína β de la leche de vaca purificada por FPLC (Anguita y col., 1995), que utilizados en un ELISA Indirecto han permitido la detección y cuantificación de un 0,1-10% de leche de vaca en la leche de oveja y cabra (Anguita y col., 1995). El mismo anticuerpo monoclonal se ha empleado en una técnica ELISA de paletas (immunostick) para la detección y cuantificación del 1% de leche de vaca en la de oveja y del 0,5% en quesos madurados (Anguita y col., 1995).

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

III.1. MATERIAL GENERAL

III.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

Todas las disoluciones acuosas se prepararon en agua destilada obtenida en un destilador "Pobel" mod. 706 y desmineralizada en un intercambiador iónico "Seta" mod. R-600.(1)

Las pesadas ordinarias se efectuaron en balanzas monoplato "AND" mod. Ex -3000 A y EW-600 A. En las pesadas de precisión se utilizaron balanzas analíticas "AND" mod. ER-120 A. Para equilibrar las muestras a centrifugar se utilizó una balanza biplato "Cobos" mod. 28.

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas "Sorvall" RG-513, equipadas con rotores SS-34 y GSA. Las microcentrifugaciones se efectuaron en una Biofuge A de "Heraeus" mod. Christ.

Los pHímetros utilizados fueron "Crison" mod. Digit 501, "Radiometer" mod. 28 y "Metrohm" mod. 654.

Las esterilizaciones se realizaron en autoclaves "Selecta" mod. Autotester G y 43-G. La esterilización del material de vidrio se efectuó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K.

Para la pasteurización de las leches se empleó un baño termostático "Bunsen" mod. BA-12.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros "Kontron" mod. Uvikon 820 e "Hitachi" mod. U-2000 de doble haz, registrándose los resultados en una impresora térmica Uvikon LS-4B y en un registrador Uvikon 21.

Las homogeneizaciones de las muestras se realizaron con ayuda de homogeneizadores "Calworth" mod. Stomacher 400 y "Sorvall" Omno-mixer 17106.

Las liofilizaciones se realizaron en un aparato Teruzzi-Mevilsa mod. TP-3 con superficie útil de carga de 0,3 m², dotado de equipo de registro, dispositivo de termovació y programador.

Las muestras se filtraron en diversos modelos de filtro "Whatman" y se dializaron en membranas de diálisis "Serva" mod. Visking dialysis tubing, type 27/32.

La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una columna de "Bio-Rad" mod. 2,5 x 37 cm. y las fracciones cromatográficas se recogieron en un colector de fracciones "LKB Bromma" mod. Helirac.

Para la cromatografía de intercambio catiónico se utilizó un equipo de "Pharmacia", compuesto de una columna mod. XK 26/20, una bomba peristáltica mod. P-1 y un colector de fracciones Redifrac.

La cromatografía líquida rápida de proteínas se (FPLC) se realizó en un FPLC de "Pharmacia", provisto de una unidad de control mod. LCC-500 Plus, dos bombas de alta presión P-500, un inyector MV-7, un monitor mod. UV-MII, un registrador mod. Rec 2, una columna Mono Q HR 5/5 y un colector automático de fracciones mod. FRAC-100.

Los tampones utilizados en las diferentes cromatografías se filtraron a vacío utilizando bombas eléctricas "Eyela" mod. A-3S y filtros de "Millipore" de 0,22 y 0,45 μm y, posteriormente, se sonicaron en un baño de limpieza por ultrasonidos "Selecta".

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones de congelación "Kelvinator" mod. ACK-55 y "Liebherr", así como en frigoríficos "Liebherr" y "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator" termostatado a 4 ± 1 °C, construido por una firma local.

En las incubaciones se utilizaron estufas "Heraeus" mod. KB-500 y "Selecta" mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), se realizaron en un Phast-System™ de "Pharmacia" que se utilizó conjuntamente con un Phast-Transfer™ de la misma firma para los inmunoblottings.

La obtención de anticuerpos monoclonales se realizó en una sala estéril con una antesala, lámparas de luz ultravioleta en los techos, una unidad de aire acondicionado "Interclinet" y un filtro de aire positivo "Telstar". Además, en su interior se encontraban una campana de flujo laminar "Telstar" mod. AV-100, un incubador "Heraeus" mod. 6000 con controlador de temperatura y CO₂, un microscopio "Nikon" mod. TMS, una centrífuga "Heraeus" Megafuge 1.0 y un baño termostatado "Grant" mod. W 14. El gas utilizado para

en el incubador fue CO₂ de calidad N-40 de alto grado de pureza y comercializado por la SEO. El material de plástico estéril utilizado fue de las marcas "Nunc" y "LabSystem".

Las células de mieloma y los hibridomas se conservaron en un arcón congelador "Sanyo" ultralow mod. MDF-392 y en bombonas de N₂ líquido mod. CDB 35 y CDB 18.

Las placas de ELISA utilizadas en los ensayos inmunoenzimáticos fueron de la marca "Costar" mod. 3590 de 96 pocillos. Su agitación se realizó en un agitador de placas de ELISA marca "Wallac", mod. 1296.001 Plateshake y para su lectura se utilizó un lector espectrofotométrico "Titertek Multiskan Plus, versión 1.4".

Como material general de laboratorio se utilizaron pipetas y micropipetas automáticas de la marca "Gilson" modelos p-5000, p-1000, p-200 y p-20, así como pipetas multicanales "Labsystem" y "Titertek", agitadores, mecheros de gas, termómetros, jeringuillas, hojas de bisturí, etc. El material de vidrio empleado en las experiencias descritas fue siempre de la marca "Pyrex".

III.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En la obtención de anticuerpos policlonales se emplearon conejos machos de raza Nueva Zelanda, de 3-3,5 Kg. de peso, mantenidos en el animalario de nuestro departamento y alimentados con dieta de mantenimiento para conejos y agua potable ad libitum.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales se emplearon ratones Balb/c de ocho semanas de edad, alimentados con dieta de mantenimiento rata-ratón y agua potable ad libitum.

III.1.2.2. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

En este trabajo se han utilizado las siguientes muestras:

A) *Muestras de leche cruda*

Leche de cabra: tuvo tres procedencias diferentes. Leche de cabra de la raza Serrana,

suministrada por la empresa "Queserías Luxtor" de Móstoles (Madrid), leche de cabra de cruce de autóctonas con Murciana, procedente de una granja diplomada de Talavera de la Reina (Toledo) y leche de cabra de raza Gran Mezcla, procedente de una granja diplomada de Fuenlabrada (Madrid).

Leche de oveja: leche de oveja de la raza Manchega, procedente de una granja diplomada de Benavente (Zamora).

Leche de vaca: leche de vaca de la raza Frisona, procedente de la empresa "Queserías Luxtor" de Móstoles (Madrid).

Las muestras de leche se recogieron directamente del tanque de refrigeración y se transportaron al laboratorio en botellas de vidrio estériles, que se introdujeron en un recipiente hermético isotermo que contenía hielo en bolsas impermeables.

B) *Muestras de quesos*: Se adquirieron en diversos centros comerciales de Madrid:

Queso de cabra: se utilizaron tres tipos diferentes dependiendo del período de maduración, siendo estos un queso fresco de origen francés, otro tierno de la marca "Garrotxa" y otro, con seis meses de maduración, procedente de la provincia de Cáceres.

Queso de oveja: De denominación de origen "Roncal" (O. M., 11/3/91 y B.O.E., 14/3/91).

Queso de vaca: De denominación de origen "Mahón" (O. M., 5/7/85 y B.O.E., 24/6/85).

C) *Células de Mieloma*

Las células de mieloma de la línea celular P3X63-Ag 8.653 fueron cedidas generosamente por el Instituto LLorente (Madrid).

III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en este trabajo fueron suministrados por alguna de las siguientes firmas: "Merck", "Sigma", "Bio-Rad", "Oxoid", "Farmacia", "Difco", "Panreac", "Dako" y "Fluka" y "Boehringer". Los medios de cultivo utilizados durante la obtención y producción de anticuerpos monoclonales fueron de la marca "Gibco"

y "Boehringer"

III.2. METODOS

III.2.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

De las muestras de leche de cabra, vaca y oveja, transportadas a nuestro Departamento en condiciones de refrigeración, se procedió a la preparación de los extractos antigénicos correspondientes.

III.2.1.1. OBTENCION DE LAS CASEINAS

Para la obtención de los extractos antigénicos denominados caseínas de la leche de cabra (CC), caseínas de la leche de oveja (CO) y caseínas de la leche de vaca (CV), se procedió como se describe a continuación (Figura III.1.).

- 1) Desnatado de la leche cruda por centrifugación a 13.000 g durante 10 minutos a 4 °C, y filtración de las muestras por un filtro con lana de vidrio.
- 2) Precipitación de las caseínas por calentamiento de la leche desnatada a 37 °C, seguido de acidificación de la misma hasta un pH de 4,6 con HCl 0,2 M. En el caso de la leche de cabra, la leche desnatada se calentó a 45 °C y se acidificó hasta un pH de 4,47 (punto isoeléctrico de las caseínas de la leche de cabra).
- 3) Mantenimiento de la leche a 40 °C durante 30 minutos y centrifugación de la muestra a 6000 g durante 30 minutos, para separar las caseínas precipitadas.
- 4) Lavado de las caseínas precipitadas durante tres veces con agua destilada, para eliminar las proteínas residuales.
- 5) Liofilización y mantenimiento de las caseínas a -20 °C, hasta su utilización.

El contenido proteico de los extractos antigénicos obtenidos, determinado por el procedimiento descrito en la sección III.2.2., fue :

- CC: 753 µg de proteína/mg de extracto liofilizado.
- CO: 730 µg de proteína/mg de extracto liofilizado.

LECHE CRUDA DE CABRA

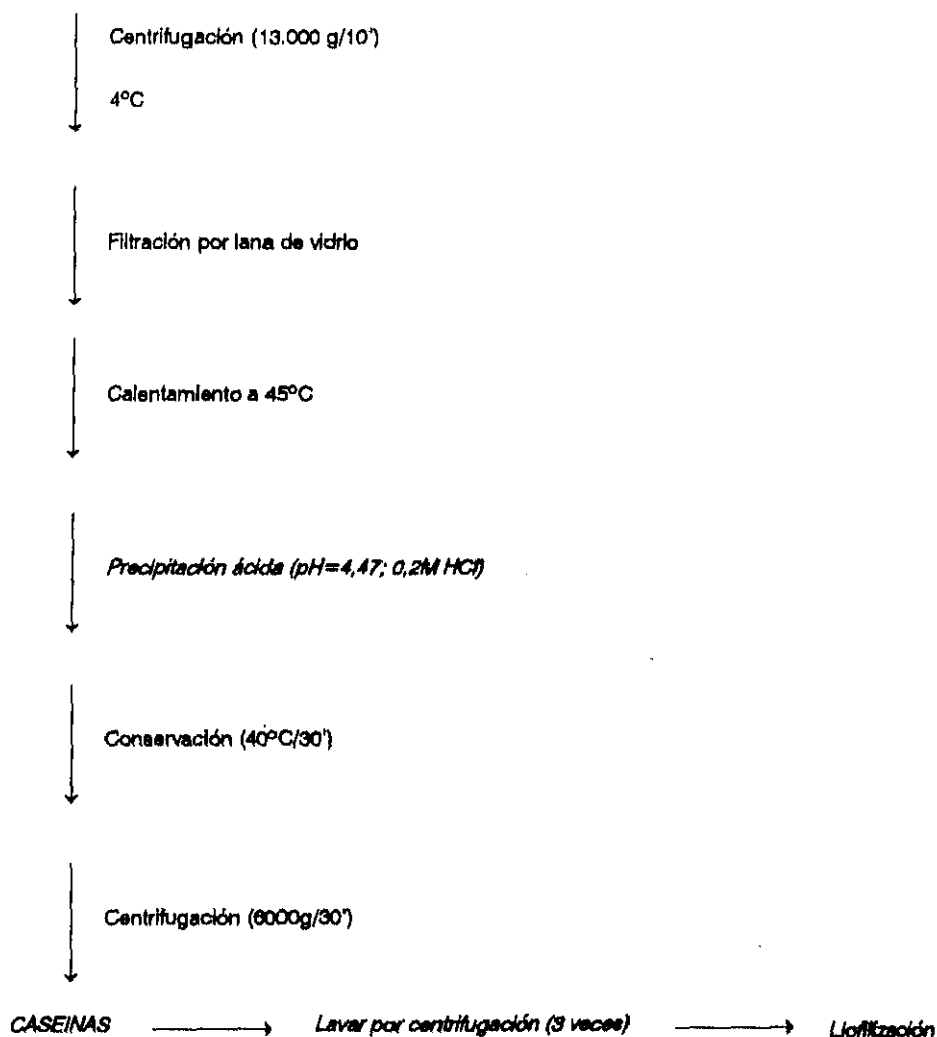


Figura III.1. Esquema de trabajo en la obtención de las caseínas de la leche de cabra

- CV: 620 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado.

El contenido de caseínas por ml de leche utilizada fue de 13,9 mg en la de cabra (CC), de 21,9 mg en la de oveja (CO) y de 18,5 mg en la de vaca (CV).

III.2.1.2. MEZCLAS LACTEAS

Se prepararon 3 mezclas experimentales de leche cruda de cabra/oveja y 3 mezclas de leche cruda de cabra/vaca, dependiendo de la procedencia de la leche de cabra. Así la mezcla I se realizó con la leche de cabra de la raza Serrana, la mezcla II con la leche de cabra de la raza autóctona-Murciana y la mezcla III con la leche de cabra de la raza Gran Mezcla, como se refleja a continuación:

	<u>Cabra</u>	<u>Oveja</u>	<u>Vaca</u>
Mezcla I	Serrana	Manchega	Frisona
Mezcla II	Autóctono-Murciana	"	"
Mezcla III	Gran Mezcla	"	"

Asimismo, la leche cruda de cabra se sometió también a los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización. La pasteurización se realizó calentando la leche de cabra a 62 °C durante 30 minutos en un baño de agua termostataado, mientras la esterilización se realizó manteniendo las muestras de leche en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se prepararon 6 mezclas experimentales de leche de cabra pasteurizada/oveja y /vaca, y de leche de cabra esterilizada /oveja y /vaca.

En todos los casos, la leche de la especie citada en segundo lugar se sustituyó por la primera en los porcentajes de sustitución del: 0, 0,125, 0,250, 0,500, 0,750, 1, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100%.

Las muestras resultantes se repartieron en alícuotas de 1 ml y se conservaron a -20 °C hasta el momento de su empleo.

III.2.1.3. MEZCLAS DE QUESOS

Se utilizaron tres tipos de queso de cabra dependiendo del período de maduración

(fresco, tierno y madurado), que se mezclaron con quesos de oveja y vaca para la obtención de seis mezclas experimentales de quesos de cabra/oveja y cabra/vaca.

	<u>Cabra</u>	<u>Oveja</u>	<u>Vaca</u>
Mezcla I	Fresco	Roncal	Mahón
Mezcla II	Tierno	"	"
Mezcla III	Madurado	"	"

Para la obtención de los extractos antigénicos de queso se utilizaron 25 gramos de queso puro o de la mezcla correspondiente, que se homogeneizaron en 250 ml de tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,2 en el stomacker y que, posteriormente, se filtraron por lana de vidrio.

Igual que en las mezclas lácteas, los quesos de la especie citada en segundo lugar se sustituyeron por los de la primera, en los porcentajes del 0, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100%. Las muestras se repartieron en alícuotas de 1 ml y se conservaron a -20 °C hasta el momento de su empleo.

III.2.2. DETERMINACION DE LA PROTEINA

El contenido proteico de los extractos antigénicos y de las fracciones caseínicas purificadas, se determinó utilizando la técnica de Lowry modificada por Markwell y col., (1978).

Lowry en 1951, desarrolló un método de para la cuantificación de proteínas basado en la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu, empleado generalmente para detectar grupos fenólicos. Este método es más sensible que el de Biuret y es útil para la detección de 10 µg y 100 µg proteína/ml de muestra. La técnica se basa en la cuantificación del color desarrollado al poner en contacto las proteínas con los reactivos que posteriormente se detallan. El desarrollo del color se debe a una combinación de reacciones:

a) En condiciones alcalinas, el cobre (Cu^{2+}) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de tipo Biuret) reduciéndose a Cu^+ .

b) El Cu^+ , junto con la tirosina y el triptófano, reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu, originando un compuesto inestable que lentamente se reduce para dar

lugar al reactivo molibdeno-túngstico de color azul. La intensidad del color depende del contenido en tirosina y triptófano de las proteínas.

Debido a que esta técnica se basa en la reactividad de los grupos fenoles de las proteínas, es necesario obtener los resultados de una curva patrón construida en cada ensayo. En nuestro caso, como proteína standar para construir la curva patrón se empleó la fracción caseínica β comercial (Sigma) de la leche de vaca.

Reactivos:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0,4%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% y tartrato sódico potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ($4\text{H}_2\text{O}$) al 0,16% en agua destilada.
- Solución B: CuSO_4 ($5\text{H}_2\text{O}$) al 4% en agua destilada.
- Solución C: Se obtiene mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.
- Solución D: Reactivo comercial de Folin-Ciocalteu ,diluido en agua destilada en la proporción 1:1 (v/v).

Procedimiento:

A 1 ml de la muestra que contenga entre 10 y 100 μg de proteína se le añaden 3 ml de la solución C, se agita y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se adicionan 0,3 ml de la solución D, se agita y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 45 minutos. Finalmente, el aumento de la absorbancia a 660 nm se mide con referencia a un blanco preparado de la misma manera, pero con agua destilada.

III.2.3. FRACCIONAMIENTO DE LA CASEINA DE LA LECHE DE CABRA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica ampliamente utilizada en la separación de los componentes proteicos de la leche. Esta técnica permite la separación de moléculas que, presentando tamaños similares, difieren ligeramente en su punto isoelectrico. La separación por cromatografía de intercambio iónico se basa en las interacciones que tienen lugar entre las moléculas de soluto y los ligandos inmovilizados en una matriz cromatográfica. Este proceso se realiza en dos fases: la primera comprende la

aplicación de la muestra ionizada y la adsorción de los iones al intercambiador; en la segunda fase, los componentes adsorbidos por el intercambiador son eluidos selectivamente de la columna, ocurriendo su separación en función de sus distintas afinidades hacia el mismo.

Un intercambiador iónico consiste de una matriz insoluble, a la cual se unen covalentemente grupos cargados asociados con contraiones móviles. El tipo de grupos cargados determina la clase y fuerza del intercambiador con intercambiadores cargados positiva o negativamente. Los primeros se denominan intercambiadores aniónicos y los segundos catiónicos. Los términos, fuerte y débil, se refieren a la extensión de la variación de la ionización con el pH.

III.2.3.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA RAPIDA DE PROTEINAS (FPLC)

La cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), se diferencia de las técnicas clásicas de cromatografía de intercambio iónico en columna abierta en la naturaleza de la fase estacionaria, que debe permitir mayores velocidades de flujo y soportar presiones elevadas.

En este trabajo se utilizó un equipo automatizado de FPLC de Pharmacia, consistente en: una unidad de control, 2 bombas de alta presión, un inyector, un monitor de UV a 280 nm, un registro y un colector automático de fracciones LKB Frac-100. La columna utilizada fue la Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) que es un intercambiador aniónico fuerte basado en una resina hidrofílica cuyo grupo funcional en el gel es $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. El fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra se realizó según el método descrito por Davies y Law (1987) para el fraccionamiento de las caseínas bovinas (Figura III.2.), con ligeras modificaciones.

III.2.3.1.1. Preparación de la caseína

Se tomaron 10 mg de la caseína liofilizada de leche de cabra (CC) que se disolvieron en 10 ml del tampón Bis-tris-propano-HCl 5 mM conteniendo 3,3 M urea (tampón cromatográfico) y se agitaron durante 5 minutos a 20 °C. A continuación, se ajustó el pH de la muestra a 7,0 y se añadieron 10 µl de 2-mercaptoetanol 14 mM, tras lo que se mantuvo en agitación durante 1 hora a 20 °C en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, esta solución se filtró por un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (GV Millipore).

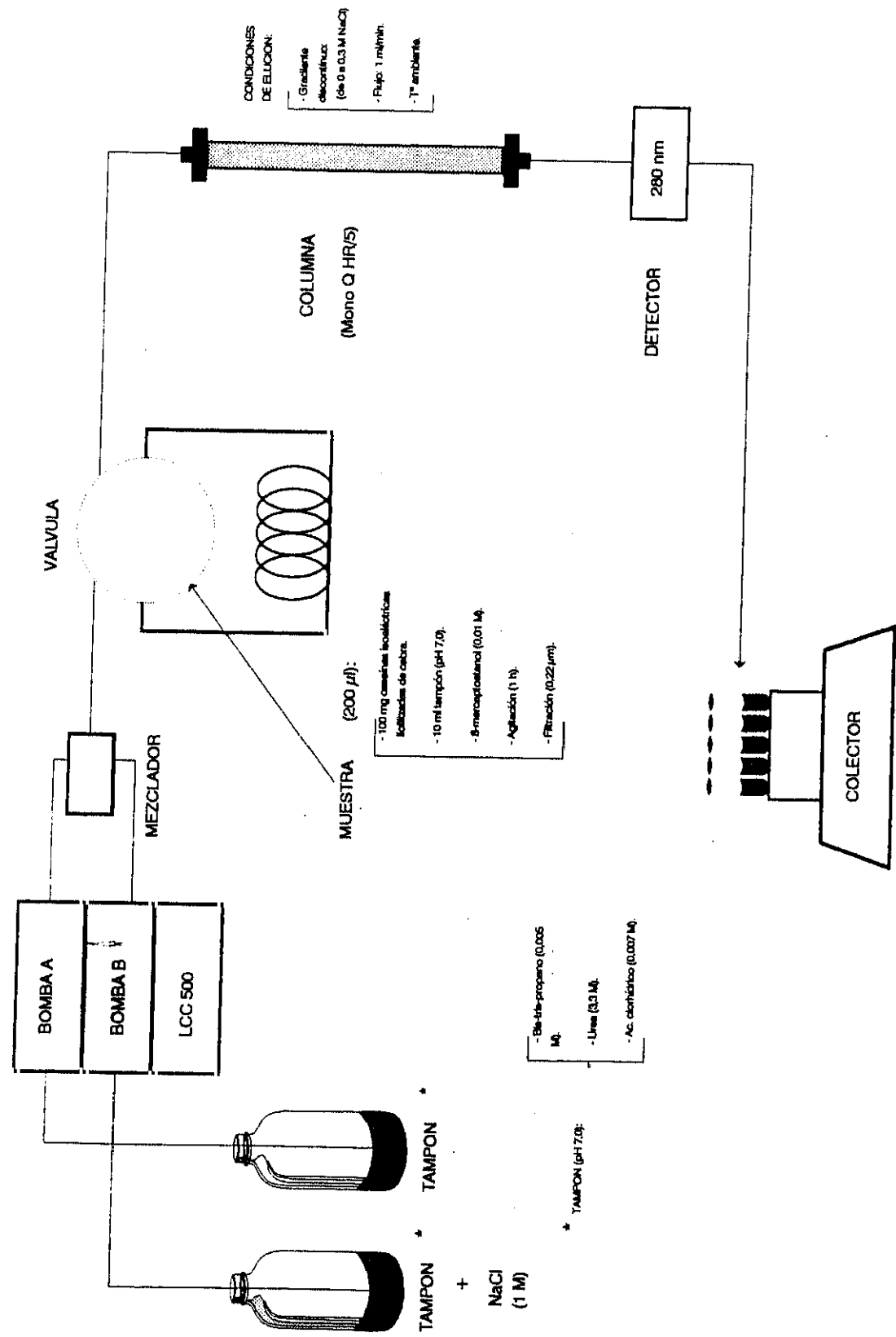


Figura III.2. Fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC)

III.2.3.1.2. Fraccionamiento

La columna se equilibró con 2,5 ml de 5 mM Bis-tris-propano-HCl (BTP) pH 7,0, seguidos de 3 ml de BTP conteniendo ClNa 1 M y de nuevo, 5 ml de BTP. A continuación, se inyectaron 200 µl de la solución de caseína que se eluyeron en un gradiente discontinuo de ClNa en tampón cromatográfico de 0 a 0,4 M, que se alcanzó como se especifica a continuación: a los 2,5 ml de elución, 0,10 M; a los 9 ml, 0,11 M; a los 14 ml, 0,22 M; a los 17,5 ml, 0,23 M; a los 20,5 ml, 0,25 M, a los 22,5 ml, 0,28 M; a los 29 ml, 0,295 M y a los 35 ml 0,40 M.

El fraccionamiento de las caseínas se realizó a temperatura ambiente y con un flujo de 1 ml/min. El eluato se recogió, según el perfil cromatográfico, en fracciones de 1 ml que se dializaron exhaustivamente durante 48 horas y se liofilizaron. La concentración de proteína de las muestras se determinó según el método descrito en el apartado III.2.2. identificando las proteínas presentes por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), en un equipo automatizado Phast-System™ de la manera descrita en el apartado III.2.4.1.

III.2.3.2. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO CON DEAE-CELULOSA

Las caseínas de leche de cabra se fraccionaron por cromatografía de intercambio aniónico débil en una columna de dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-celulosa), según el método descrito por Mercier y col. (1968) para el fraccionamiento de las caseínas de la leche de oveja.

III.2.3.2.1. Preparación de la celulosa y relleno de la columna

Para ello se emplearon 21 g de DEAE-celulosa (Sigma D-8257), que se resuspendieron en agua desionizada, se filtraron y lavaron con NaCl 0,5 M y NaOH 0,1 M hasta un pH básico; con agua desionizada hasta pH neutro y con HCl 0,75 M hasta un pH ácido. Finalmente, el soporte cromatográfico se lavó con agua destilada hasta que el filtrado quedó libre de HCl, depositándolo en una columna de vidrio de Bio-Rad (2,5 x 37 cm), que se equilibró con 2 litros de tampón imidazol-HCl 0,02 M, pH 7,0. Como germicida, se añadió azida sódica al 0,01% y la columna se mantuvo a 4° C hasta su utilización.

III.2.3.2.2. Preparación de la caseína

Se partió de 1 g de caseína liofilizada de cabra (CC) se disolvió en 25 ml del tampón imidazol-HCl 0,02 M, con urea 3,3 M y un 0,1% de 2-mercaptoetanol, pH 7,0. Esta solución se dializó frente a 500 ml del mismo tampón durante 24 h a 4 °C.

III.2.3.2.3. Fraccionamiento

Inmediatamente antes de su uso la columna se lavó con 1 litro de tampón cromatográfico (imidazol-HCl 0,02 M, conteniendo urea 3,3 M y un 0,1% de 2-mercaptoetanol, pH 7,0), tras lo cual la solución de caseína se depositó en la parte superior de la columna. Cuando la muestra penetró en el lecho cromatográfico, se hicieron pasar 150 ml de tampón cromatográfico, seguidos de un gradiente continuo de NaCl de 0 a 0,3 M en 2,5 litros del mismo tampón. El fraccionamiento de las caseínas se realizó a temperatura ambiente con un flujo del tampón de elución de 2 ml/min.

El eluido se recogió en fracciones de 20 ml y la absorbancia de las mismas se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. La mezcla de las fracciones cromatográficas de interés se realizó según los datos del perfil cromatográfico, y las fracciones resultantes se dializaron exhaustivamente durante 48 horas, se liofilizaron y congelaron.

III.2.3.3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN UNA MATRIZ DE S-SEPHAROSE FAST-FLOW

Las caseínas de la leche de cabra también se fraccionaron en una columna con una matriz de S-Sepharose Fast Flow, que es un intercambiador catiónico fuerte con un soporte de agarosa con los grupos funcionales $-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$. La técnica se realizó esencialmente de la manera descrita por Jaubert y Martín (1992) (Figura III.3.).

III.2.3.3.1. Preparación de la matriz y relleno de la columna

Se emplearon 225 ml de S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) hidratada, con los que se relleno una columna de vidrio de Pharmacia (XK 26/20) y se equilibró con 700 ml de un tampón cromatográfico que contenía 0,064 mM dithiothreitol (DTT), 75 mM formato sódico y 7,5 M urea, pH 4,0. Como germicida se añadió azida sódica al 0,01%.

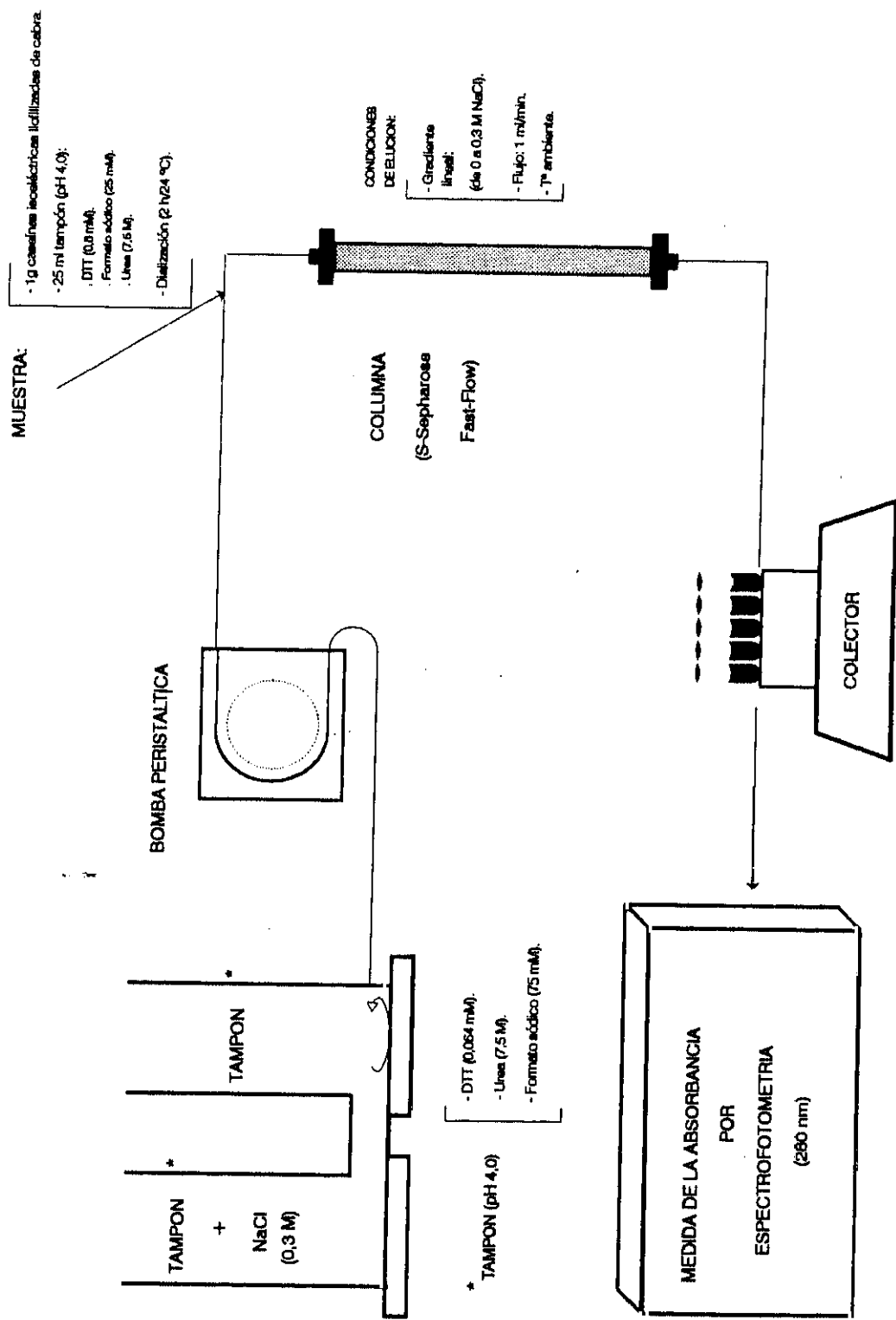


Figura III.3. Fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra por cromatografía de intercambio catiónico

III.2.3.3.2. Preparación de la caseína

Se tomó 1 g de caseína liofilizada de leche de cabra (CC) que se disolvió en 25 ml de un tampón que contenía 0,8 mM DTT, 25 mM formato sódico y 7,5 M urea, pH 4,0. Esta solución se dializó frente a 250 ml del mismo tampón, durante 2 horas a 24 ° C.

III.2.3.3.3. Fraccionamiento

La muestra con las caseínas se depositó en la parte superior de la columna y cuando penetró en el lecho cromatográfico se hicieron pasar 100 ml del tampón cromatográfico, seguidos por un gradiente continuo de NaCl de 0 a 0,3 M en 2 litros del mismo tampón. La elución se efectuó a temperatura ambiente, con un flujo de 2 ml/min con la ayuda de una bomba peristáltica.

El eluido se recogió en fracciones de 20 ml y la absorbancia de las mismas se determinó a 280 nm en un espectrofotómetro. La mezcla de las fracciones cromatográficas de interés se realizó según los datos del perfil cromatográfico y las fracciones resultantes se dializaron exhaustivamente durante 48 horas, se ajustó su pH a 7,0, se liofilizaron y se determinó su concentración de proteína según el método descrito en el apartado III.2.2.

Una vez obtenido el contenido proteico de las fracciones caseínicas resultantes, se caracterizaron electroforéticamente (SDS-PAGE) en un equipo automatizado Phast-System™ de la manera descrita en el apartado III.2.4.1.

III.2.4. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS

Las fracciones caseínicas purificadas por FPLC y cromatografía de intercambio catiónico se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) para identificar las proteínas presentes en las muestras de interés.

III.2.4.1. ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente que, como otros agentes como el mercaptoetanol y el calor, interviene en la disociación de las proteínas en subunidades.

Todas las subunidades polipeptídicas poseen la misma cantidad de SDS por unidad de peso (1,4 g SDS/g de proteína) confiriendo a las cadenas polipeptídicas una carga negativa por lo que todos los polipéptidos tendrán, por lo tanto, la misma densidad de carga y, su separación se realizará en función de su tamaño. De esta forma, cuando el complejo SDS-proteína se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS, su velocidad de migración vendrá determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido, según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico, en este caso, sólo suministra la fuerza impulsora.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), se realizó empleando un equipo de electroforesis Phast-System™ (Pharmacia), dotado de una unidad de separación y control y otra unidad de tinción. Para ello se utilizaron geles comerciales polimerizados (Phast Gel Homogeneous 20) y tiras de tampón (Phast Gel SDS) de Pharmacia.

Descripción y composición del Phast Gel Homogeneous 20 (Pharmacia)

Rango de separación	2 - 150 KDa
Dimensiones (mm)	43 x 50 x 0.45
Material	Acrilamida

Gel de concentración

Longitud (mm)	13
Composición (%T,%C)	7 / 3

Gel de resolución

Longitud (mm)	32
Composición (%T,%C)	20 / 2
Tampón	0,112 M acetato, 0,112 M Tris, pH 6,4

Siendo % T = g acrilamida + g bisacrilamida / 100 ml de solución x 100 y

% C = g bisacrilamida / % T.

Descripción y composición de las tiras de tampón Phast Gel SDS (Pharmacia)

Dimensiones (mm)	41 x 10 x 6
Material	3 % Agarosa IEF

Tampón	0.20 M Tricina, 0,20 M Tris, 0,55 % SDS, pH 8,1
--------	--

III.2.4.1.1. Preparación de las muestras

Las muestras con las caseínas se disolvieron en un tampón que contenía 10 mM Tris-ClH, 1 mM EDTA, pH 8,0, 2,5 % SDS, 5% 2-mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol. Las muestras se calentaron hasta ebullición durante 5 minutos y se enfriaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de depositar 5 µl de cada solución (10 µg de proteína) en el extremo catiónico del gel.

III.2.4.1.2. Electroforesis

Una vez colocadas las muestras, las condiciones programadas en el equipo automatizado Phast-System™ fueron de 250 voltios, 10 miliamperios, 3 watios, durante 90 voltios/hora a 15 °C, según el manual de instrucciones del equipo (Pharmacia, nota de aplicación nº 111).

III.2.4.1.3. Teñido y destañido del gel

Terminada la electroforesis, los geles se tiñeron y destiñeron automáticamente en la unidad de tinción con Coomassie R-350 (Phast Gel Blue R) durante 40 minutos a 50 °C, siguiendo las condiciones descritas en el manual de instrucciones (Pharmacia, nota de aplicación nº 200). La composición de las diferentes soluciones se describe a continuación :

Solución de tinción

Phast Gel Blue R	0,1 %
Metanol	30%
Agua destilada	10%

Esta solución debe filtrarse por papel (Whatman nº 1) antes de su uso.

Solución de Fijación

Glicerol	5%
Acido Acético	10%
Agua destilada	85%

La solución final de tinción se obtuvo mezclando la solución de tinción con la solución de fijación al 50% (v/v).

Solución decolorante

Metanol	30%
Acido acético	10%
Agua destilada	60 %

III.2.5. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA PARCIAL DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS

Las fracciones caseínicas de la leche de cabra obtenidas por FPLC y cromatografía de intercambio catiónico, se caracterizaron inmunológicamente utilizando la técnica inmunológica del ELISA Indirecto descrita en el apartado III.2.8.1.

La fracción caseínica α_{s2} de la leche de cabra purificada por cromatografía de intercambio catiónico resultó ser la fracción más inmunógena y por esta razón, se ha utilizado en la obtención de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales.

III.2.6. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES

III.2.6.1. PROTOCOLO DE INMUNIZACION

Para la producción de anticuerpos policlonales se emplearon 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda, de 3-3,5 Kg. de peso. La inmunización de los animales se realizó con 1,3 mg del extracto antigénico emulsionados en una mezcla a partes iguales (0,5 ml) de Adyuvante Completo de Freund y de solución salina estéril. Las inoculaciones se realizaron durante tres meses a intervalos de siete días, sustituyendo, a partir de la segunda inyección el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto. La vía de inoculación elegida para la primera dosis fue la intradérmica, repartida en varios lugares de la espalda del animal previa depilación de la zona. Esta vía se repitió una vez al mes, siendo las restantes dosis administradas por vía intramuscular.

III.2.6.1.1. Comprobación de la Inmunización

Antes de la primera inoculación y para comprobar la ausencia de reactividad de los

animales frente al antígeno utilizado, se realizó una sangría inicial con extracción de la sangre de la vena marginal de la oreja de los animales. Asimismo, cada 15 días se realizaron sangrías parciales para verificar la eficacia del proceso de inmunización, determinando la reactividad de los inmunosueros utilizando la técnica del ELISA Indirecto descrito en el apartado III.2.8.1.

III.2.6.1.2. Sangría Final

A los 115 días de comenzado el proceso de inmunización y una vez comprobado que el título de los inmunosueros era el adecuado, se efectuó la sangría final de los animales por punción intracardíaca, recogiendo aproximadamente 150 ml de sangre de cada animal.

III.2.6.1.3. Obtención y conservación del suero

La sangre obtenida se trasvasó lentamente a tubos de ensayo limpios y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se mantuvo a 4 °C para favorecer su retracción. El suero resultante se trasvasó a tubos de centrifuga estériles y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 g a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido se distribuyó en fracciones de 2 ml a las que se añadió una solución de azida de sodio al 0,01% como agente conservador. Los viales se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de su utilización.

III.2.6.2. PURIFICACION PARCIAL DE LOS INMUNOSUEROS

Los inmunosueros obtenidos se purificaron parcialmente por precipitación selectiva con sulfato amónico.

III.2.6.2.1. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico

La precipitación de las proteínas con sulfato amónico es uno de los métodos más utilizados para la separación de las proteínas de una solución. El método se basa en que las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares, por lo que cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el sulfato y el amonio, estos compiten con las moléculas de agua. Así, las

proteínas al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad, lo que origina su precipitación. La concentración a la cual precipita cada proteína depende de numerosos factores como el número y la posición de los grupos polares, el peso molecular de la proteína, el pH de la solución y la temperatura a la cual se realiza la precipitación. Además, la concentración de sulfato amónico necesaria para precipitar las inmunoglobulinas varía con la especie animal de la que proceden, aunque la más conveniente en la mayoría de los casos es una solución al 50% (p/v) (Harlow y Lane, 1988).

La precipitación de las inmunoglobulinas de los inmunoseros obtenidos frente a la fracción caseínica α_{S2} de la leche de cabra, se realizó según el protocolo de Harlow y Lane (1988), que se describe a continuación :

- Centrifugar 5 ml de suero a 3000 g durante 30 minutos.
- A los sobrenadantes obtenidos se le añadieron, gota a gota y en agitación, 5 ml de una solución saturada de sulfato amónico (76,1 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en 100 ml de agua destilada) cuyo pH se había ajustado a 7,4 con NaOH 1N inmediatamente antes de su empleo.
- La mezcla resultante se mantuvo durante toda la noche a 4 °C y se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos para recuperar las inmunoglobulinas precipitadas.
- Eliminado el sobrenadante, las inmunoglobulinas del sedimento se resuspendieron en 2,5 ml de tampón fosfato salino (PBS, de pH 7,2) y, a continuación, se dializaron durante 16 horas a 4 °C con tres cambios de PBS. Finalizada la diálisis, las inmunoglobulinas se distribuyeron en alícuotas de 2 ml manteniéndose a -20 °C hasta su utilización.

III.2.7. OBTENCION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La obtención de hibridomas productores de anticuerpos de especificidad definida, se describió por primera vez por Köhler y Milstein en 1975. La técnica consiste en fusionar células secretoras de anticuerpos del un bazo de los animales inmunizados con células de mieloma (un tipo de célula B tumoral) de ratón. Las células secretoras aportan al híbrido la capacidad de producción de anticuerpos específicos para el antígeno utilizado en la inmunización y las células de mieloma, la posibilidad de un crecimiento continuo "in vitro". Esta técnica permite, en principio, inmortalizar cualquiera de los linfocitos B con distinta

especificidad, de un ratón o de humanos respectivamente, de forma que secreten en torno a 10^3 moléculas de anticuerpo por segundo, fuera del control de elementos del sistema inmune distintos de los que tiene el propio hibridoma. Los anticuerpos producidos por las células híbridas o hibridomas reciben el nombre de anticuerpos monoclonales (Ac_m).

III.2.7.1. PROTOCOLO DE INMUNIZACION

En la obtención de Ac_m frente a la fracción caseína α_{s2} de la leche de cabra, se emplearon ratones Balb/c de ocho semanas de edad. La inmunización de los ratones comenzó con la inoculación intraperitoneal de la caseína α_{s2} (0,1 mg) emulsionados en una mezcla a partes iguales (0,1 ml) de Adyuvante Completo de Freund y de solución salina estéril. Las inoculaciones se realizaron durante 2 meses a intervalos de 7 días, sustituyendo, a partir de la segunda inyección el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto. Cuatro días antes de la fusión, al ratón con un título mayor de anticuerpos se le inyectaron intraperitonealmente 0,1 mg de la fracción caseínica α_{s2} disueltos en 0,2 ml de solución salina estéril.

III.2.7.1.1. **Comprobación de la inmunización**

Durante la inmunización de los ratones se realizaron varias sangrías parciales, para lo cual, se extrajo sangre de la base de la cola de los ratones mediante incisión perpendicular al eje mayor, la cual fue recogida por capilaridad. De la sangre obtenida se obtuvo el suero resultante, cuya reactividad frente al antígeno de interés se determinó utilizando la técnica del ELISA Indirecto descrito en el apartado III.2.8.1

III.2.6.2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES EMPLEADAS

Medio de cultivo completo (CRPMI)

<u>Ingredientes</u>	<u>Por 100 ml</u>
RPMI-1640 sin glutamina (Gibco)	100
L-Glutamina (100x) (Gibco)	1
Solución de Penicilina-Estreptomicina (Gibco)	1
Suero Fetal Bovino (Gibco)	15

Las botellas de suero fetal bovino se mantuvieron a 56 °C durante 30 minutos para inactivar el complemento.

Medio de cultivo sin suero

Es medio de cultivo completo (CRPMI) pero sin suero fetal bovino.

Medio de cultivo completo suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT- CRPMI)

Contiene medio de cultivo completo suplementado con un 2% del medio HAT (50 x, Gibco)

Medio de cultivo completo suplementado con hipoxantina y timidina (HT-CRPMI)

Contiene medio de cultivo completo suplementado con un 2 % del medio HT (50 x, Gibco)

BM- Condimed^R H1 (Böehringer Mannheim Biochemica)

El medio BM-Condimed^R H1 consta de una mezcla compleja de factores de crecimiento y citoquinas, los cuales estimulan el crecimiento de los hibridomas después de la fusión y durante el clonaje. Utilizado como suplemento, evita la necesidad de utilizar células acondicionadoras de los medios de cultivo empleados. Se añade al 10% a los medios de cultivo de los hibridomas CRPMI, HAT-CRPMI y HT-CRPMI.

Soluciones de tinción

Células de Mieloma : Se tiñen con una solución de tripán azul al 2% en agua destilada.

Linfocitos: Se tiñen con una solución de tripán azul al 0,2% en agua destilada.

El azul tripán es un colorante vital que tiñe de azul las células no viables, por lo que éstas no deben ser contadas.

Mezcla de congelación

Consiste en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck) al 10% en suero fetal

de ternera descomplementado.

III.2.7.3. OBTENCION DE LOS HIBRIDOMAS

Para la obtención de los hibridomas, se procedió a la fusión de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados con las células de mieloma.

III.2.7.3.1. **Obtención de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados**

Para la obtención de los linfocitos esplénicos se procedió a la extracción del bazo del animal mejor inmunizado. Tras el sacrificio del animal por dislocación cervical, se le sumerge al mismo en un baño de alcohol al 70% para su desinfección y se coloca en posición de decúbito lateral izquierdo, para con las tijeras y pinzas estériles escindir primero la piel y luego el peritoneo. La pieza anatómica extraída se depositó en una placa de Petri que contenía 10 ml del medio de cultivo sin suero y con una hoja de bisturí estéril se eliminó la grasa existente para evitar que los adipocitos distorsionen la imagen de los linfocitos o de los hibridomas al microscopio, al mismo tiempo que se realizaron pequeños cortes en el bazo. Realizada esta operación, el bazo se recogió con una pipeta Pasteur estéril de plástico y se colocó sobre una malla estéril situada sobre un vaso de precipitados (también estéril), para macerarlo con el émbolo de una jeringuilla de 5 ml.

Los linfocitos suspendidos en el medio se recogieron con una pipeta Pasteur de boca ancha y se transfirieron a un tubo de centrifuga, centrifugándolos a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento resultante se lavó con 10 ml del medio de cultivo sin suero, estimando su concentración celular mediante recuento con el hemocitómetro de Neubauer y tinción con tripán azul (Figura III.4.).

III.2.7.3.2. **Células de mieloma**

Utilizamos la línea celular P3X63-Ag 8.653, que son células de mieloma de ratones Balb/c, con mutaciones que inactivan el enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT⁻) y que tienen las siguientes características: crecimiento continuo *in vitro* dividiéndose en las condiciones óptimas de cultivo cada 24 horas, alta eficacia de clonación, alta eficiencia de fusión con los linfocitos de ratón y que no producen cadenas de inmunoglobulinas por sí mismas. Estas células deben descongelarse unos 15 días antes de la fusión para su aclimatación y para comprobar la viabilidad celular, posible existencia de

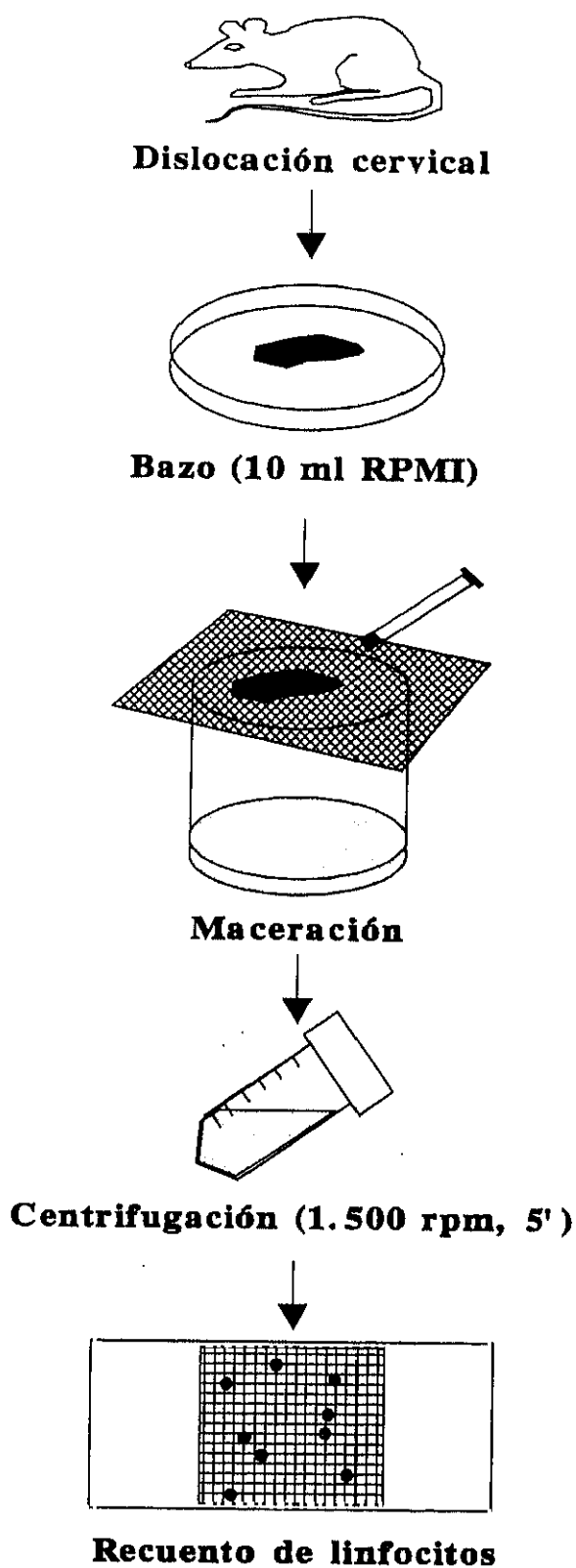


Figura III.4. Obtención de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados

contaminaciones, etc.

III.2.7.3.3. Mantenimiento y propagación de las células

Se partió de un vial de células de mieloma congeladas en nitrógeno líquido, con una densidad celular de 5×10^6 células/ml. Rápidamente se introdujo el vial en un baño a 37 °C y, una vez descongelado, se resuspendió en 20 ml del medio de cultivo completo con ayuda de una pipeta estéril. Esta nueva suspensión celular se repartió en 2 frascos de cultivo de 75 cm² (dependiendo de la densidad celular) y los frascos se rellenaron con un volumen similar o ligeramente superior del medio de cultivo completo. Los frascos se incubaron en posición horizontal a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂ y las células de mieloma se subcultivaron cada 48 horas.

III.2.7.3.4. Preparación de las células para la fusión

En el momento de realizar la fusión, es conveniente que las células de mieloma se encuentren en la fase de crecimiento logarítmico, por lo que se subcultivaron el día anterior a la misma.

El mismo día de la fusión, las células de mieloma se recogieron de los frascos de cultivo y se distribuyeron en tubos de centrifuga estériles, centrifugándolas a 1500 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo el sedimento en medio de cultivo sin suero para lavarlas dos veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de lavar las células se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml del medio de cultivo sin suero para determinar su concentración celular.

III.2.7.3.5. Preparación del agente fusionante

La fusión celular es un proceso poco frecuente de manera espontánea, por lo que se requiere la utilización de agentes que promuevan la fusión de las células. Actualmente, el polietilenglicol (PEG) es el agente fusionante más utilizado porque proporciona resultados reproducibles y una eficacia de fusión elevada. El PEG fusiona las membranas plasmáticas de las células de mieloma y de los linfocitos adyacentes, formando una única célula con 2 o más núcleos. Estas células multinucleadas reciben el nombre de heterocariontes, pudiéndose fusionar los núcleos en la siguiente división celular, presentando entonces las células hijas aumentada su dotación cromosómica. En este trabajo, como agente fusionante utilizamos el PEG de Pm 1.500 (Böehringer Mannheim GmbH), que previamente a su uso se calentó

durante 1 minuto en un baño a 37 °C.

III.2.7.3.6. Fusión celular

El protocolo utilizado para la fusión celular fue el siguiente :

- Las concentraciones de células utilizadas en la fusión, se ajustaron de modo que la proporción final entre los linfocitos esplénicos y las células de mieloma fuese de 5 : 1.

- La mezcla celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en 10 ml del medio de cultivo sin suero. El lavado de las células se realiza dos veces más.

- Después de eliminar completamente el sobrenadante, el pellet celular se libera de la pared del tubo con pequeños golpecitos, introduciendo el tubo de centrífuga en un baño a 37 °C, tras lo cual se procedió a realizar la fusión celular añadiendo 1 ml de PEG, gota a gota y agitando, durante 1 minuto.

- Transcurrido este tiempo, el PEG se diluyó lentamente y en agitación con medio de cultivo sin suero:

- Se añade 1 ml del medio de cultivo sin suero durante 1 minuto
- Se añaden 3 ml del medio de cultivo sin suero durante 3 minutos
- Se añaden 16 ml del medio de cultivo sin suero durante 6 minutos

- Una vez diluído el PEG, las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y un 5% de CO₂ y se sedimentaron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos

- Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 50 ml del medio HT-completo (HT-CRPMI) suplementado con un 10 % de BM-Condimed, distribuyendo la suspensión celular en alícuotas de 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂

III.2.7.4. SELECCION Y MANTENIMIENTO DE LOS HIBRIDOMAS

Una vez concluida la fusión celular entre los linfocitos y las células de mieloma, es posible la existencia de fusiones mieloma-mieloma, linfocito-linfocito y mieloma-linfocito,

presentando este último dos subpoblaciones, una secretora y otra no secretora de anticuerpos específicos. Como se pretende la supervivencia de los híbridos linfocito-mieloma, es necesario establecer una primera selección a partir del medio de cultivo.

III.2.7.4.1. Medio selectivo

Esta selección se efectúa añadiendo al medio de cultivo componentes como la aminopterina del medio HAT que bloquea la síntesis de novo de los nucleótidos. De esta manera las células deficientes en el enzima HPGRT, esto es, los híbridos mieloma-mieloma y las células de mieloma no fusionadas, mueren cuando este compuesto se encuentra en el medio de cultivo. El segundo tipo de híbridos formados, los híbridos linfocito-linfocito y los linfocitos no fusionados son células que mueren naturalmente tras 7-10 días de cultivo. El tercer tipo de híbridos, es decir el mieloma-linfocito sobrevive en el medio selectivo HAT, pues la célula de mieloma le aporta la capacidad de reproducirse de forma ilimitada, mientras el linfocito aporta el enzima necesario (HGPRT) para la síntesis de nucleótidos, utilizando la ruta de salvamento. Además, el medio de cultivo HAT incorpora hipoxantina y timidina como nucleótidos de refuerzo a la ruta de salvamento.

A las 24 horas de realizada la fusión comenzó la selección de los hibridomas de interés añadiendo 100 µl/pocillo del medio HAT (HAT-CRPMI) que bloquea el crecimiento del mieloma parental. Tras mantener los híbridos formados 7-10 días en este medio, se da por finalizada esta primera etapa de selección.

Para el mantenimiento de los hibridomas, se ha seguido la siguiente pauta :

- El cambio de medio de las placas de fusión se realizó cada 48 horas
- Los seis primeros cambios se realizaron con el medio HAT-CRPMI para realizar la selección de los híbridos mieloma-linfocito
- Los tres siguientes cambios se realizaron con el medio HT-CRPMI
- Los cambios posteriores se realizaron con medio completo CRPMI
- Aproximadamente cada dos cambios de medio, se añadió al medio de cultivo el componente BM-Condimed al 10%

III.2.7.4.2. Pre-selección de los hibridomas productores de anticuerpos de interés

Los procesos de fusión y selección son claves para el éxito en la producción de

hibridomas. Para seleccionar los híbridos de interés, es necesario analizar el sobrenadante de los pocillos de las placas, y si a esto le unimos que es necesario efectuar este ensayo a distintos tiempos durante la producción de los Ac_m , podemos decir que la detección de los hibridomas productores de anticuerpos constituye una de las partes más laboriosas del proceso. Es imprescindible, por tanto, disponer para ello de una técnica sencilla, rápida y económica.

Existen una gran variedad de métodos para realizar la selección de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de interés, pero como norma general, debe elegirse el mismo método para el que vaya a ser utilizado el Ac_m y utilizar procedimientos que permitan analizar grandes cantidades de muestras. En nuestro caso, la técnica utilizada ha sido el ELISA Indirecto descrito en el apartado III.2.8.1., utilizando como antígenos las caseínas de la leche de oveja, vaca y cabra.

III.2.7.5. CLONACION DE LOS HIBRIDOMAS DE INTERES

Una vez seleccionados los híbridos productores de los anticuerpos de interés, se procedió a su clonación por dilución límite. El clonaje es importante, porque reduce el riesgo de un sobrecrecimiento de las células que por haber perdido cromosomas implicados en la síntesis de inmunoglobulinas, se han transformado en no secretoras y, por esta razón, poseen una velocidad de crecimiento mayor.

La clonación se efectuó por el método de dilución límite, para lo cual se tomó una alícuota del contenido del pocillo positivo y se determinó su concentración celular. A las células se les añadió el medio completo-HAT o medio completo-HT, dependiendo del estado de la fusión, para realizar diluciones seriadas a la mitad que se sembraron en placas de 96 pocillos. Se partió de una concentración celular de unas 800 células/200 μ l/pocillo hasta llegar a una densidad celular de 0,5 células/200 μ l/pocillo. El clonaje se repitió 3 veces.

III.2.7.5.1. Expansión de los clones

Después de la clonación de los hibridomas positivos, se procedió a la expansión de los mismos y a la obtención masiva de Ac_m para su posterior análisis y caracterización. La expansión de los hibridomas se efectuó mediante subcultivo de las placas de 96 pocillos a placas de 48 pocillos, a placas de 24 pocillos, a placas de 6 pocillos y a frascos de cultivo de 25 cm² y de 75 cm².

III.2.7.5.2. Conservación de los clones

Los clones se conservaron por duplicado en congelación a -80°C y en N_2 líquido para que no perdieran su viabilidad. Para ello se determinó la concentración de las células de los frascos de cultivo mediante recuento en el hemocitómetro de Neubauer y tinción con tripán azul y, posteriormente, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se distribuyeron en criotubos a una concentración celular de 5×10^6 células/ml en una mezcla de congelación compuesta de un 90% de suero fetal bovino y un 10% de DMSO. La congelación en N_2 se realizó lentamente: el contenedor con los criotubos se sometió durante unas horas a la acción de los vapores de N_2 líquido para, posteriormente, introducirlos totalmente en el contenedor.

III.2.7.6. PRODUCCION DE Ac_m EN GRAN ESCALA

La producción de Ac_m en grandes cantidades se realizó mediante dos sistemas diferentes, el cultivo de hibridomas y la inducción de ascitis.

III.2.7.6.1. Cultivo de los hibridomas

Los cultivos de los hibridomas se realizaron en frascos de cultivo Nunc de 75 cm^2 . El sobrenadante de los frascos se recogió cada 2 ó 3 días, sustituyéndolo por medio fresco, el medio de cultivo completo CRPMI + 10% BM-condimed. El crecimiento celular continuó hasta la recolección de, aproximadamente, 50 ml de sobrenadante que se repartió en alícuotas de 2 ml y se congeló a -20°C hasta su utilización.

III.2.7.6.2. Producción de líquido ascítico

Para inducir la ascitis, los ratones Balb/c se sensibilizaron mediante la administración de 0,5 ml de pristane (2, 6, 10, 14 tetrametildecanoico) y, transcurridos 7 días, se les inoculó por vía intraperitoneal una concentración de células de los hibridomas de interés de 1×10^6 en 0,5 ml de PBS estéril. La recolección del líquido ascítico de los ratones, se realizó a los 15 días de la inoculación por punción intraperitoneal. El líquido ascítico recogido se incubó 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C ; posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó en alícuotas de 1 ml a -20°C .

Los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares y de los

líquidos ascíticos, se purificaron por precipitación con sulfato amónico como se describe en el apartado III.2.6.1.

III.2.7.7. CARACTERIZACION ISOTIPICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La clase y subclase de los Ac_m específicos frente a las caseínas de la leche de cabra, se determinaron por un ELISA Indirecto, utilizando un inmunosuero comercial de conejo frente a las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA de ratón, utilizando un Kit comercial de Sigma.

III.2.7.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para ello, se partió de 1 ml de los sobrenadantes y líquidos ascíticos, leyendo la absorbancia de las muestras resultantes a 280 nm según lo descrito por Harlow y Lane (1988).

III.2.7.9. ESPECIFICIDAD

La especificidad de los Ac_m de interés, se evaluó para observar la existencia de reacciones cruzadas con caseínas de otras especies animales con los que el epítipo diana pudiera ser confundido.

En la determinación de la especificidad de los Ac_m se utilizaron dos pruebas inmunológicas: un ELISA Indirecto y la técnica de Inmunoblotting. En el ELISA Indirecto los anticuerpos monoclonales se enfrentaron a un extenso panel de antígenos que incluían las caseínas de la leche cruda de cabra, oveja y vaca; proteínas musculares solubles de vaca, caballo, pollo y cerdo y las proteínas de gelatina, soja y seroalbúmina bovina. La metodología utilizada se describe en el apartado II.2.8.1.

En la técnica del inmunoblotting el anticuerpo monoclonal B2B 11C se enfrentó a las caseínas totales de las especies de leche de cabra, oveja y vaca, además de hacerlo frente a las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio catiónico de la leche de cabra. La metodología empleada se describe en el apartado III.2.8.4.

III.2.7.10. CONJUGACION DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS CON LA BIOTINA

El marcaje de los anticuerpos por conjugación con la biotina es una técnica muy simple y exitosa. La biotinización no posee ningún efecto adverso en el anticuerpo y las condiciones de unión son suaves. Los anticuerpos biotinizados se detectan utilizando estreptavidina o avidina; ambas moléculas son tetravalentes y los sitios adicionales de enlace pueden utilizarse para incrementar el tamaño del complejo de detección y, por tanto, la fuerza de la señal.

La mayoría de las biotinizaciones se realizan utilizando un éster succinamida de biotina. El acoplamiento se produce a través de grupos amino libres en el anticuerpo u otra proteína, normalmente, de la lisina. Si un grupo amino libre forma parte de un lugar de la proteína que es esencial para su actividad (para un anticuerpo normalmente el sitio de combinación con el antígeno), la biotinización con el éster de succinamida puede disminuir la actividad de la proteína, y deberán utilizarse otros métodos de marcaje. Para el marcaje de nuestros anticuerpos con la biotina se procedió como sigue :

- Se preparó una solución de N-hidroxysuccinamida biotina en DMSO a una concentración de 1 mg/ml.
- Los anticuerpos purificados se disolvieron en un tampón borato sódico (0,1 M, pH 8,8) a una concentración de 1 mg/ml.
- La solución de biotinase añadió a la del anticuerpo, en una concentración de 25-250 µg de éster/mg de anticuerpo, mezclando bien las soluciones que se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.
- A la mezcla anterior de biotina/anticuerpo, se le añadieron 20 µl/250 µg de éster de una solución 1 M de NH₄Cl. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- La biotina libre se eliminó de la mezcla por diálisis de la misma durante 16 horas a 4 °C frente a PBS.
- Los anticuerpos conjugados se congelaron en alícuotas de 1 ml a -20 °C hasta el momento de su utilización.

III.2.8. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA)

III.2.8.1. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

En este trabajo se han utilizado dos variantes de la técnica del ELISA Indirecto. La primera es un ELISA Indirecto clásico que emplea un conjugado comercial de anticuerpos anti-especie unidos al enzima peroxidasa de rábano, mientras la segunda es un ELISA Indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina. Esta técnica se diferencia de la primera, en que los anticuerpos específicos se conjugan con la biotina (biotinización) y la detección de este complejo se realiza con un conjugado comercial de avidina o estreptavidina marcada con un enzima.

La técnica del ELISA Indirecto se basa en que los antígenos fijados a una superficie inerte son reconocidos por los correspondientes anticuerpos específicos y el complejo formado se detecta por un segundo anticuerpo marcado con un enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. La reacción es visible porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

a) Antígenos

En el desarrollo de este trabajo se han empleado una gran variedad de antígenos:

- Caseínas de la leche cruda de cabra, oveja y vaca, obtenidas como se describe en el apartado III.2.1.1.
- Fracciones caseínicas purificadas por FPLC y cromatografía de intercambio catiónico.
- Extractos cárnicos que contienen las proteínas musculares solubles de cerdo, caballo, pollo y vaca
- Proteínas de gelatina, soja y seroalbúmina bovina.
- Leches crudas y calentadas de cabra, oveja y vaca.
- Mezclas lácteas, preparadas como se describe en el apartado III.2.1.2.
- Quesos frescos, tiernos y madurados de cabra, oveja y vaca.
- Mezclas experimentales de quesos (apartado III.2.1.3.)

b) Anticuerpos

Se utilizaron también varios inmunosueros:

- Los anticuerpos específicos anticaseínas de la leche de cabra, purificados por cromatografía de afinidad frente a los extractos liofilizados de las caseínas de las leches de oveja y vaca y, posteriormente, biotinizados (obtenidos previamente en nuestro Departamento por Rodríguez y col., 1991).

- Los anticuerpos anti-caseína α_{s2} de la leche de cabra obtenidos por la inmunización de conejos y purificados parcialmente por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

- Los Anticuerpos monoclonales frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra obtenidos por inmunización de ratones Balb/c y fusión posterior de los linfocitos del bazo con células de mieloma. Estos anticuerpos se emplearon parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico, sin biotinizar y también biotinizados.

c) Conjugado

En la detección y cuantificación de los anticuerpos marcados con biotina, se empleó un conjugado comercial de estreptavidina-peroxidasa de rábano.

En la detección y cuantificación de los anticuerpos sin biotinizar, se emplearon un conjugado comercial anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cerdo y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano (anticuerpos policlonales) o de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra marcadas con peroxidasa de rábano (anticuerpos monoclonales).

d) Tampones y Reactivos

1.- Tampón PBS de pH 7,2

Se compone de :	NaCl	8,0 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	2,9 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	KCl	0,2 g
	Agua destilada	1 L

2.- Tampón PBST

Se prepara como el tampón PBS y se le añade un 15% de Tween 20.

3.- Sustrato

El sustrato empleado fue el ácido 2-2'azino-bis-3-etilenbenzotiazolina sulfónico (ABTS) (Böehringer Mannheim), comercializado como tabletas que contienen el ABTS y que se disuelven en un tampón que contiene perborato sódico, ácido cítrico y fosfato disódico.

4.- Solución de tapizado

Gelatina al 1% en tampón PBS de pH 7,2.

e) Metodología del ELISA Indirecto

Los 96 pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 µl de las muestras antigénicas correspondientes disueltas en tampón PBS y la placa se incubó durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se lavó 5 veces con tampón PBST. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 µl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37 °C y los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo correspondiente diluidos en tampón PBST y la placa se incubó en un agitador de placas de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron de nuevo 5 veces con tampón PBST para eliminar los restos de anticuerpo que no hubieran reaccionado. Seguidamente, se depositaron en cada pocillo 100 µl del conjugado diluido en tampón PBST y, de nuevo, la placa se mantuvo en el agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 5 veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 µl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 20 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control de antígeno: gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato
- Control de anticuerpo: antígeno + gelatina + conjugado + sustrato
- Control de conjugado: gelatina + conjugado + sustrato

Si la absorbancia a 405 nm de alguno de los controles era mayor de 0,150, el experimento se consideraba nulo.

III.2.8.2. TECNICA DEL ELISA SANDWICH

En esta técnica, los anticuerpos específicos se fijan a una fase sólida y actúan como anticuerpos de captura de los antígenos problema. Los antígenos anclados son reconocidos por los mismos anticuerpos conjugados con la biotina y el complejo formado se detecta con un conjugado comercial de estreptavidina-peroxidasa. La reacción se pone de manifiesto, porque al actuar el enzima sobre el sustrato, se libera un compuesto coloreado.

a) Antígenos

Como antígenos se emplearon las mezclas de leche crudas con los porcentajes de sustitución indicados en la sección III.2.1.2.

b) Anticuerpos de captura y de detección

Se emplearon dos sistemas diferentes:

	Captura	Detección
1.-	Ac. monoclonales	Ac. policlonales
2.-	Ac. policlonales	Ac. monoclonales

d) Conjugado

Se emplearon el conjugado comercial de antiinmunoglobulinas de conejo o el de antiinmunoglobulinas de ratón, según el anticuerpo de detección empleado.

e) Tampones y reactivos

Además de los descritos en la sección III.2.8 d, se utilizó el tampón carbonato-

bicarbonato de pH 9,6 cuya composición es la siguiente:

- Tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6

Na_2CO_3	2,93 g
NaHCO_3	2,93 g
Agua destilada	1 L

e) Metodología del ELISA Sandwich

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 μl de los anticuerpos de captura correspondientes diluidos en tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6 y la placa se incubó durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar los anticuerpos no adsorbidos a la placa. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubieran adsorbido los anticuerpos, se añadieron a cada uno de ellos 200 μl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37 °C y los pocillos se lavaron de nuevo 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 μl del antígeno correspondiente diluidos en tampón PBST y la placa se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado con PBST, se depositaron en cada pocillo 100 μl del anticuerpo de detección correspondiente y la placa se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado con PBST, se añadieron a cada pocillo 100 μl del conjugado disuelto en PBST y la placa se incubó una hora en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar los pocillos 5 veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre, se añadió a cada pocillo 100 μl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 20 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de los pocillos a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control de antígeno: anticuerpo de captura + gelatina + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.
- Control del anticuerpo de captura: gelatina + antígeno + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.
- Control del anticuerpo de detección: anticuerpo de captura + gelatina + antígeno + conjugado + sustrato.
- Control de conjugado: gelatina + conjugado + sustrato.

III.2.8.3. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

En esta técnica, el antígeno específico se fija a una superficie inerte, y, a continuación, se añaden el anticuerpo específico con la muestra problema (de concentración antigénica desconocida) que competirá con el antígeno adsorbido por el anticuerpo específico. El ensayo se cuantifica por la concentración de conjugado comercial que se une al complejo anticuerpo-antígeno adsorbido. Como control se utilizan pocillos sin la muestra problema, cuantificando la diferencia de absorbancias entre los pocillos con la muestra problema o sin ella ambos, que es indicativa de la concentración del antígeno de interés en la muestra problema.

a) Antígenos

En esta técnica se han empleado tres formatos antigénicos diferentes:

- 1.- Leche cruda de cabra
- 2.- Caseínas totales de la leche de cabra (CC)
- 3.- Caseína α_{s2} de la leche de cabra purificada por cromatografía de intercambio catiónico

b) Anticuerpos

Se empleó el anticuerpo monoclonal B2B 11C purificado por precipitación con sulfato amónico.

c) Muestra problema

Las muestras problema utilizadas comprendieron los diferentes porcentajes de sustitución de leche de oveja y vaca por la de cabra, así como las de sustitución de quesos de oveja y vaca por el de cabra.

d) Conjugado

Como conjugado se utilizó uno comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra, marcado con el enzima peroxidasa de rábano.

d) Tampones y reactivos

Se emplearon los utilizados en la técnica del ELISA Indirecto descritos en la sección III.2.8.1 d.

e) Metodología del ELISA Competitivo

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 µl de la muestra antigénica correspondiente y la placa se incubó toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, tras lavar 5 veces las placas con PBST y para tapizar las zonas de los pocillos en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 µl de gelatina al 1% en tampón PBS. La placa se mantuvo durante 30 minutos a 37 °C y los pocillos se lavaron de nuevo 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl del anticuerpo monoclonal y 50 µl de la muestra problema, diluïdos en tampón PBST y la placa se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado de los pocillos con PBST para eliminar las proteínas que no se hubieran unido, se añadieron a cada pocillo 100 µl del conjugado comercial diluïdo en tampón PBST y, de nuevo, la placa se incubó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar los pocillos 5 veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 µl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 20 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control de antígeno: gelatina + anticuerpo + muestra problema + conjugado + sustrato.
- Control del anticuerpo : antígeno + gelatina + muestra problema + conjugado + sustrato.
- Control de la muestra problema : antígeno + gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato.
- Control de conjugado: gelatina + conjugado + sustrato.

III.2.8.4. TECNICA DEL INMUNOBLOTTING

La identificación del epítipo o epítipos reconocidos por nuestro anticuerpo en los antígenos de interés, se realizó utilizando la técnica del inmunoblotting. Esta técnica consiste en la transferencia electroforética de proteínas separadas por electroforesis, de un gel de

poliacrilamida a una membrana sintética, seguida de un método inmunológico de identificación de las proteínas de la membrana. El inmunoblotting es un método muy sensible de identificación de proteínas específicas en una mezcla antigénica compleja y tiene muchas aplicaciones en la detección, identificación y caracterización de proteínas, así como de visualización de las interacciones proteína-proteína.

La transferencia electroforética de las proteínas de los geles de poliacrilamida a las membranas de nitrocelulosa, se realizó utilizando un equipo automatizado Phast-Transfer™ de Pharmacia (semi-dry electrophoretic transfer system), dotado de dos unidades independientes: el separador del gel y la caja de electrodos utilizado conjuntamente con la unidad de separación y control del Phast-System™. El equipo automatizado Phast-Transfer™ transfiere las proteínas de una manera rápida y reproducible; además la utilización de geles de poliacrilamida pequeños, combinados con la transferencia semiseca, minimizan la cantidad de reactivos y tampones utilizados en otros sistemas de transferencia de proteínas.

1- Separación electroforética de las proteínas

La separación electroforética de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida con SDS utilizando un equipo automatizado Phast-System™ de Pharmacia y siguiendo la técnica descrita en el apartado III.2.4. Como muestras antigénicas se depositaron en el gel las caseínas totales de la leche de cabra, oveja y vaca, además de las fracciones caseínicas de la leche de cabra obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizaron dos geles idénticos, uno de los cuales se tiñó de la manera descrita como en el apartado III.2.4. y, el otro, se utilizó en la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

2- Transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida la membrana de nitrocelulosa

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm , utilizando el equipo automatizado Phast-Transfer™. Las condiciones programadas para la transferencia fueron 20 V, 25 mA, 5 V a 15 °C de temperatura y durante 15 minutos. El tampón de transferencia utilizado consistió en una solución 25 mM tris, 192 mM glicina, 20 % metanol, de pH 8,3.

3- Inmunoidentificación de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa

Terminada la transferencia electroforética de las proteínas, se procedió a la realización

de un ELISA Indirecto sobre la membrana de nitrocelulosa.

a) Antígenos

Como antígenos se emplearon las proteínas separadas electroforéticamente y transferidas a la membrana de nitrocelulosa.

b) Anticuerpo

Se empleó el anticuerpo monoclonal B2B 11C parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico.

c) Conjugado

Se utilizó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra y marcadas con peroxidasa de rábano.

d) Tampones y Reactivos

1.- Tampón Tris salino (TBS), pH 7.5

Se compone de :	NaCl	29,24 g
	Tris	2,42 g
	Agua desionizada	1 L

2.- Tampón TBST

Se prepara como el tampón TBS y se le añade un 0,05% de Tween 20.

3.- Sustrato

Como sustrato se utilizó la diaminobenzidina (Sigma) disuelta en tampón Tris-HCl 50 mM de pH 7,6 (6 mg de diaminobenzidina/ 10 ml tampón). Esta solución debe filtrarse por papel de filtro Whatman nº 1 y, en el momento de la adición a la membrana, se le añaden 100 µl de H₂O₂ / 10 ml de tampón.

4.- Solución bloqueante

Seroalbumina bovina al 1% en tampón TBS de pH 7,5.

e) Metodología del ELISA Indirecto sobre membrana de nitrocelulosa

Terminada la transferencia electroforética, la membrana de nitrocelulosa se lavó durante 10 minutos en tampón TBS para eliminar los posibles restos de gel que pudieran quedar. A continuación, se añadió a la membrana la solución bloqueante en tampón TBST y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA, tras los que se volvió a lavar durante 10 minutos en tampón TBST. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal B2B 11C diluído (1/1000) en tampón TBST durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, la membrana se lavó de nuevo con TBST y se le añadió el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón diluído en TBST manteniéndose en el agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana con agua destilada, la especificidad del anticuerpo monoclonal B2B 11C sobre las proteínas de la membrana de nitrocelulosa, se visualizó añadiendo el sustrato.

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV.1. FRACCIONAMIENTO DE LA CASEINA DE LA LECHE DE CABRA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

El fraccionamiento de la caseína total de la leche de cabra, se realizó de la manera descrita en la sección III.2.3. de esta memoria.

IV.1.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA RAPIDA DE PROTEINAS (FPLC)

El fraccionamiento de la caseína total de la leche de cabra por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) en una columna Mono Q HR 5/5, utilizando un gradiente discontinuo de ClNa de 0 a 0,4 M, se muestra en la Figura IV.1. Los resultados obtenidos indican la separación de la caseína total en tres fracciones mayoritarias (1, 2 y 3), bien separadas, que por comparación con el perfil de elución de las caseínas de la leche de vaca (Davies y Law, 1987), se identificaron como caseína κ (1), β (2) y α_s (3) respectivamente. Las fracciones individuales integrantes de las tres fracciones mayoritarias se mezclaron, dializaron y liofilizaron, determinando su concentración determinó su concentración de proteína según el método descrito en el apartado II.2.2. de esta memoria, resultando lo siguiente :

- Fracción nº 1: 128 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado.
- Fracción nº 2: 115 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado.
- Fracción nº 3: 260 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado.

Conocida la concentración de proteína de las fracciones resultantes, se determinó el rendimiento proteico por gramo de caseína liofilizada de cabra (CC), que fue de 50 mg para la fracción nº 1, 55 mg para la fracción nº 2 y 130 mg para la fracción nº 3. Una vez determinada la concentración de proteína de cada fracción, se realizó la identificación de las proteínas presentes en las mismas, por electroforesis de las fracciones en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el equipo automatizado Phast-System™.

IV.1.1.1. CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS POR FPLC

La separación e identificación de las proteínas integrantes de las fracciones caseínicas

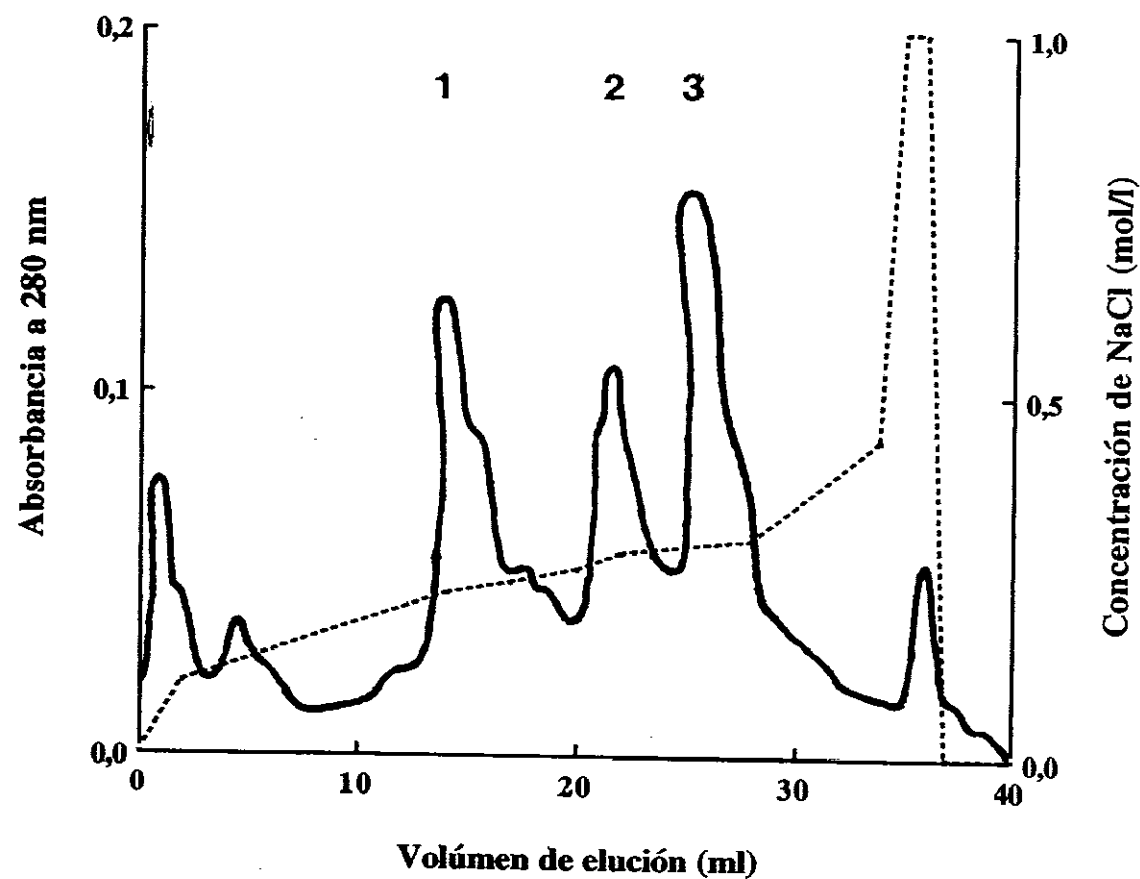


Figura IV.1. Fraccionamiento de la caseína de la leche de cabra por FPLC, en una columna Mono Q HR 5/5. Las caseínas eluidas se recogieron en 3 fracciones mayoritarias (1-3).

purificadas por FPLC, utilizando la electroforesis de SDS-PAGE, se muestra en la Figura IV.2. Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas del primer pico eluido (1) contienen la caseína κ , la segunda fracción (2) contenía la caseína β y la tercera (3) la fracción caseínica α_s (α_{s1} y α_{s2}). Estos resultados confirman los obtenidos del perfil de elución e indican una separación aceptable de las caseínas κ , β y α_s , purificadas, aunque la separación entre las caseínas α_{s1} y α_{s2} resulta incompleta.

IV.1.2. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO CON DEAE-CELULOSA

En la Figura IV.3. se observa el fraccionamiento de la caseína total de la leche de cabra, por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-celulosa y un gradiente lineal de ClNa de 0 a 0,3 M. Las caseínas eluyeron en 5 fracciones distintas, no bien separadas, por lo que se concluyó que esta técnica comúnmente utilizada para el fraccionamiento de las caseínas bovinas y ovinas (Mercier, 1968), no permite una separación adecuada de las cuatro caseínas caprinas.

IV.1.3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN UNA MATRIZ DE S-SEPHAROSE FAST-FLOW

La figura IV.4. el fraccionamiento de 1 g de caseína caprina, por cromatografía de intercambio catiónico en una columna con una matriz de S-Sepharose Fast-Flow, utilizando un gradiente lineal de ClNa de 0 a 0,3 M. Los resultados obtenidos indican la separación de la caseína total en cinco fracciones diferentes (1, 2, 3, 4 y 5), que se dializaron exhaustivamente, se liofilizaron y se determinó su concentración de proteína mediante una modificación del método de Lowry (Markwell y col., 1978), descrito en el apartado III.2.2.

El contenido proteico de las fracciones fue el siguiente:

- fracción 1: 526 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado
- fracción 2: 44 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado
- fracción 3: 9 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado
- fracción 4: 503 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado
- fracción 5: 461 μ g de proteína/mg de extracto liofilizado

El rendimiento proteico por gramo de caseína liofilizada de cabra (CC), fue de 462 mg para la fracción nº 1, 9,3 mg para la fracción nº 2, 2,5 mg para la fracción nº 3, 123 mg para la fracción nº 4 y 91 mg para la fracción nº 5. La identificación y pureza de las

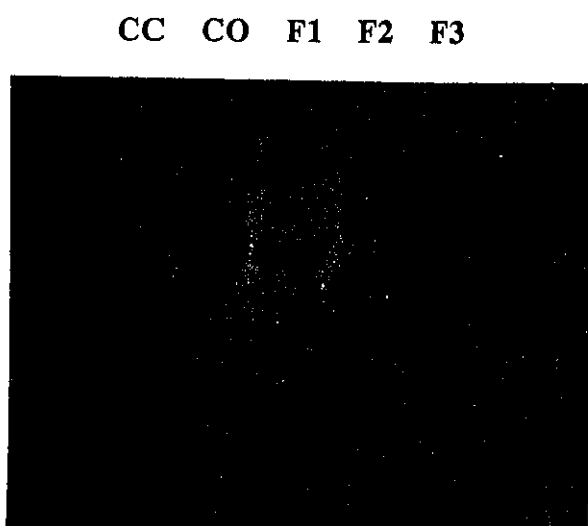


Figura IV.2. Electroforesis SDS-PAGE-PhastSystemTM de las caseínas de la leche de cabra fraccionadas por FPLC en geles de poliacrilamida al 20%. Línea CC, caseínas totales de la leche de cabra; línea CO, caseínas totales de la leche de oveja; línea F1, fracción 1 (caseína κ); línea F2, fracción 2 (caseína β); línea F3, fracción 3 (caseína α_s).

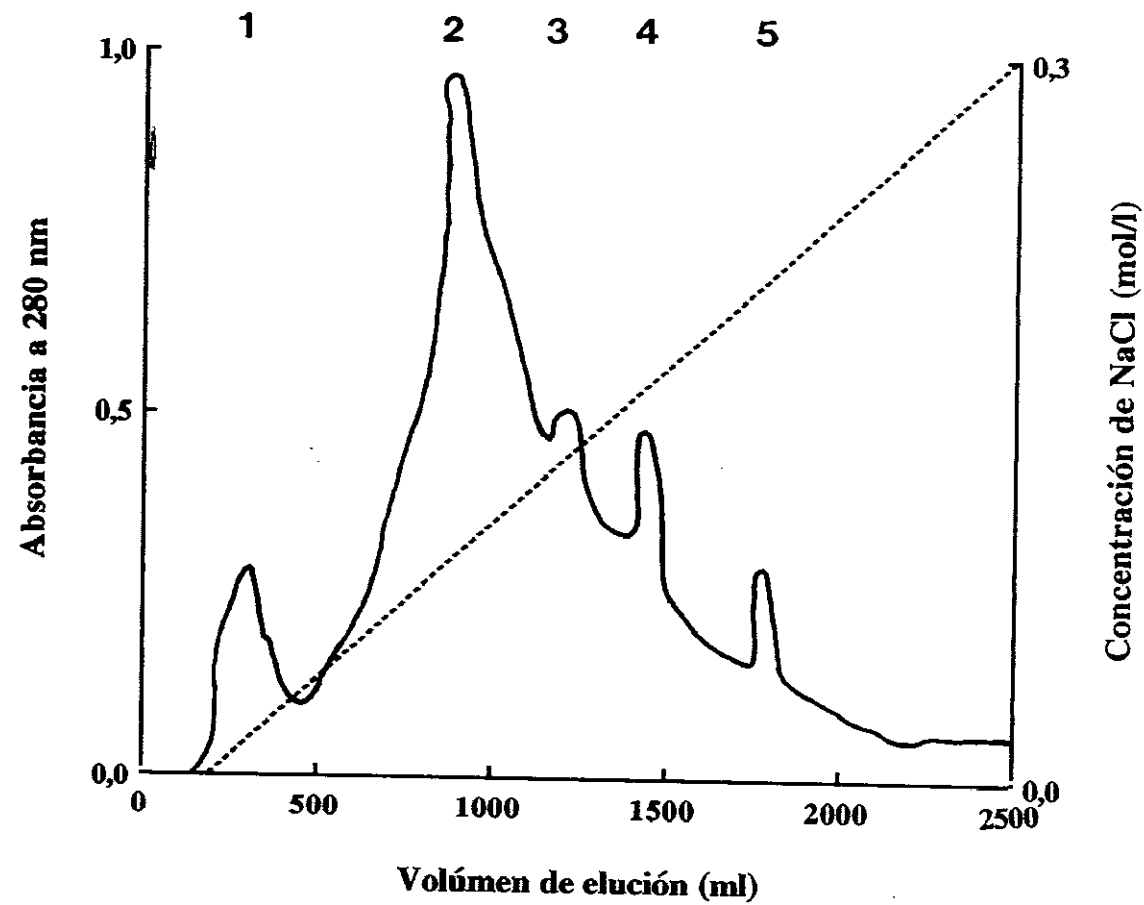


Figura IV.3. Fraccionamiento de la caseína de la leche de cabra por cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-celulosa

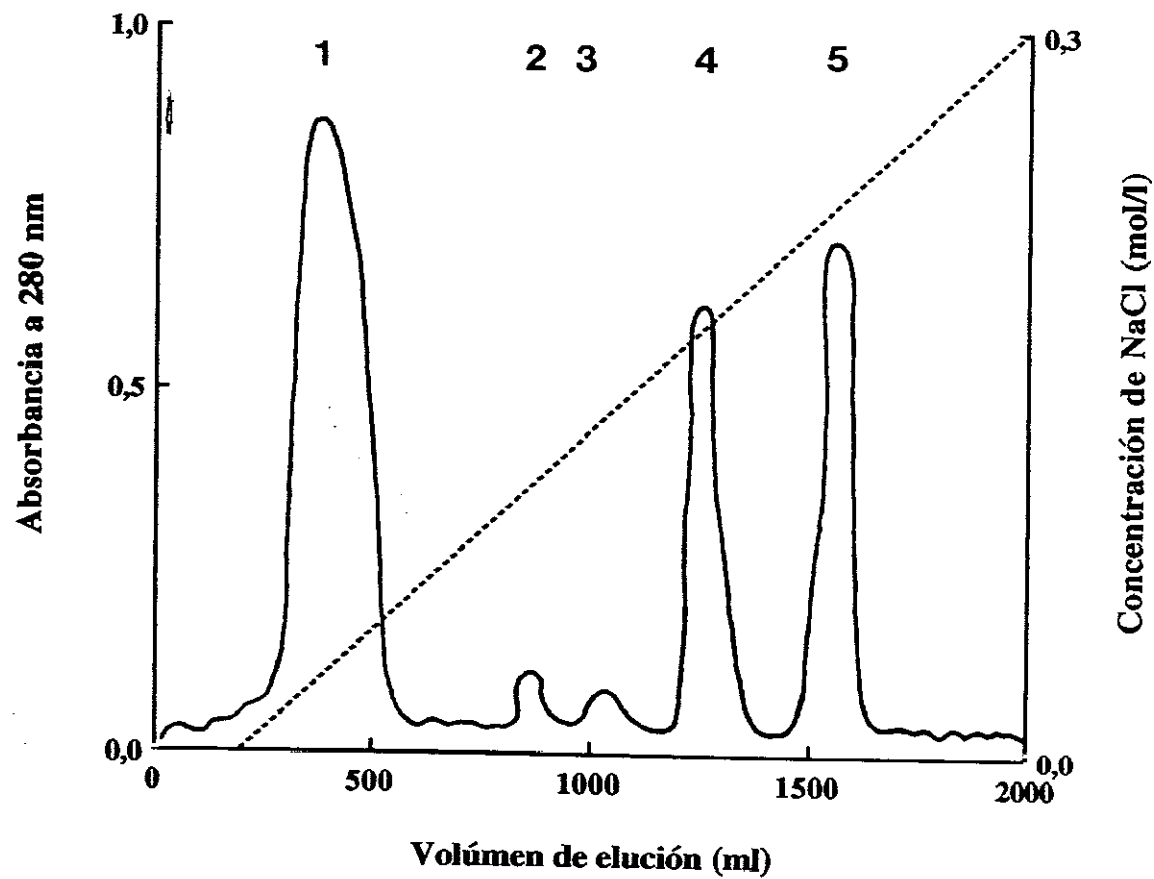


Figura IV.4. Fraccionamiento de la caseína de la leche de cabra por cromatografía de intercambio catiónico en una matriz de S-Sepharose Fast-Flow. Las caseínas eluidas se recogieron en 5 fracciones mayoritarias (1-5).

proteínas de las fracciones, se determinó por electroforesis de las mismas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el equipo automatizado Phast-System™.

IV.1.3.1. CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO

Los resultados de la caracterización electroforética de las fracciones caseínicas obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico, se muestran en la Figura IV.5. Estos resultados confirman los obtenidos por Law y Tziboula (1992) y sugieren que la fracción 1 contiene la caseína β completa de la leche de cabra, por lo que no se consiguió la separación de las dos formas de esta caseína (β_1 y β_2), probablemente debido a que la única diferencia entre ellas es el grado de fosforilación (6 grupos fosfato en la β_1 y 5 en la β_2) y, por lo tanto, la diferencia de sus pesos moleculares es muy pequeña. La fracción 2, que migró por encima de la caseína β de acuerdo con su menor peso molecular, contenía la caseína κ . La fracción 3, contenía pequeñas bandas proteicas no identificadas y que no se utilizaron en análisis posteriores. La fracción 4, contenía la caseína α_{s1} con residuos de las caseínas β y κ y, finalmente, la fracción 5 contenía mayoritariamente la caseína α_{s2} , migrando por encima de la banda de la caseína α_{s1} , de acuerdo con su peso molecular ligeramente mayor. En esta última fracción también se detectaron bandas de proteína con un peso molecular inferior al de la caseína α_{s2} , que probablemente sean fracciones minoritarias de la caseína α_s , identificadas previamente por Gröschl y col. (1987).

IV.2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA PARCIAL DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS

Una vez separadas las fracciones caseínicas de la leche de cabra, empleando diversas técnicas cromatográficas y una vez identificadas las proteínas de las fracciones electroforéticamente, la siguiente etapa de este trabajo consistió en la caracterización inmunológica de las mismas mediante un ELISA Indirecto. El ensayo utiliza anticuerpos policlonales obtenidos en conejo frente a la caseína total de la leche de cabra (anti-CC), purificados por cromatografía de afinidad en una columna conteniendo caseínas de la leche de cabra inmovilizadas (CC) y, posteriormente, biotinizados y neutralizados frente a los extractos liofilizados de las caseínas de la leche de vaca (CV) y oveja (CO) (Rodríguez y col., 1991).

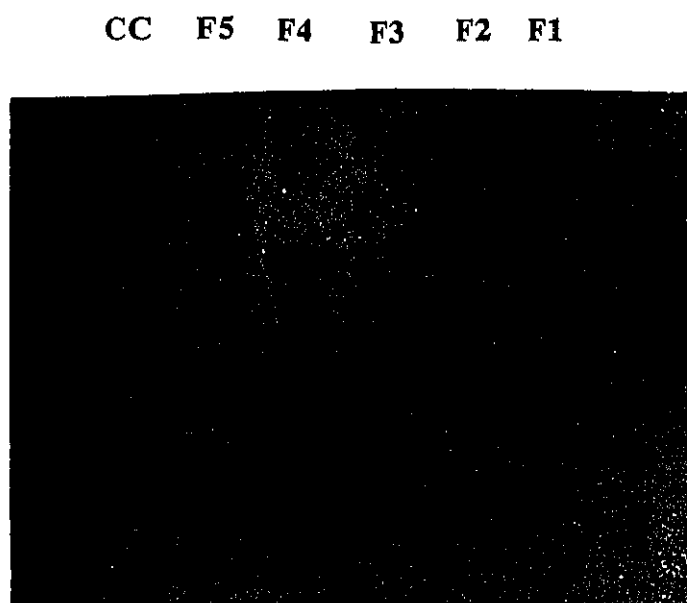


Figura IV.5. Electroforesis SDS-PAGE-PhastSystemTM de las caseínas de la leche de cabra fraccionadas por cromatografía de intercambio catiónico en geles de poliacrilamida al 20%. Línea CC, caseínas totales de la leche de cabra; línea F1, fracción 1 (caseína β); línea F2, fracción 2 (caseína κ); línea 3, fracción 3 (bandas difusas de proteína); línea F4, fracción 4 (caseína α_{s1} , con caseínas β y κ); línea F5, fracción 5 (caseína α_{s2} , mayoritariamente).

Para determinar las concentraciones adecuadas de los componentes del ensayo, se realizaron numerosos experimentos, como antígenos se emplearon, además de las fracciones purificadas por FPLC y cromatografía de intercambio catiónico, las caseínas totales de la leche de vaca (CV), oveja (CO) y cabra (CC) a diferentes concentraciones (0 a 20 μg de proteína en tampón PBS). Como conjugado, se utilizó uno comercial de Streptavidina-peroxidasa. Las diluciones de trabajo óptimas de los inmunosueros fueron de 1/1000 (v/v) en tampón PBST, mientras que la del conjugado fue la 1/3000 (v/v) en tampón PBST.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras IV.6. y IV.7., donde se muestran los valores de absorbancia a 405 nm de cada una de las fracciones purificadas, así como de las caseínas totales utilizadas como antígenos y de los que se desprende que los inmunosueros anti-CC reconocen muy poco a las caseínas de la leche de oveja (CO), observando los mismos resultados frente a las caseínas de la leche de vaca (CV) (no se muestran los datos). Los valores de absorbancia más altos se obtuvieron con la fracción 3 (caseína α_s) purificada por FPLC (Figura IV.6.), fracción 5 (caseína α_{s2}) purificada por cromatografía de intercambio catiónico (Figura IV.7.) y con la caseína total de cabra (CC) (Figuras IV.6. y IV.7.). La caseína α_{s1} purificada por cromatografía de intercambio catiónico (Figura IV.7.) mostró valores de absorbancia más bajos que la fracción α_{s2} purificada por el mismo método. Las fracciones caseínicas κ y β obtenidas por FPLC (Figura IV.6.) y por cromatografía de intercambio catiónico (Figura IV.7.), obtuvieron unos valores de absorbancia mucho más bajos o, lo que es lo mismo, mostraron muy poca inmunoreactividad frente al inmunosuero específico de las caseínas de la leche de cabra.

Se puede por tanto, afirmar que la fracción 5 de la leche de cabra (caseína α_{s2}), obtenida por cromatografía de intercambio catiónico es la más inmunoreactiva frente al inmunosuero específico anti-CC, probablemente porque es la fracción con un mayor número de epítopos específicos de las caseínas de la leche de cabra. Esta fracción se utilizó en la inmunización de conejos para la obtención de anticuerpos policlonales y, de ratones Balb/c, como primer paso en la obtención de anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseína de la leche de cabra.

IV.3. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Para la obtención de los inmunosueros se emplearon conejos que se inmunizaron con la caseína α_{s2} de la leche de cabra, purificada por cromatografía de intercambio catiónico. Antes de comenzar el protocolo de inmunización, a los conejos se les extrajo una muestra de

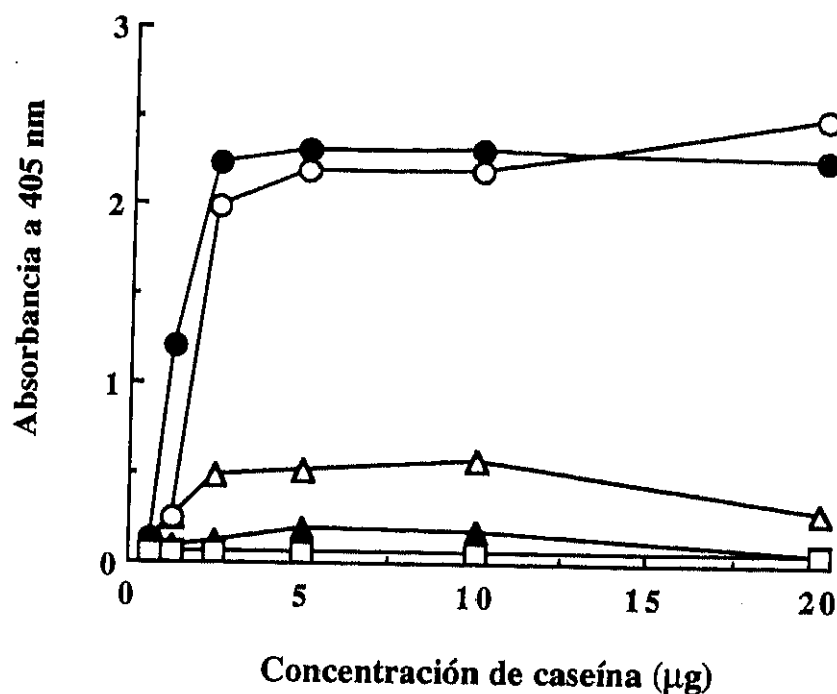


Figura IV.6. ELISA Indirecto de las fracciones caseínicas purificadas por FPLC, utilizando anticuerpos biotinizados específicos frente a las caseínas totales de la leche de cabra (anti-CC). Fracción 1 (▲, caseína κ), fracción 2 (Δ, caseína β), fracción 3 (○, caseína α_s), caseínas totales de oveja (□) y caseínas totales de cabra (●).

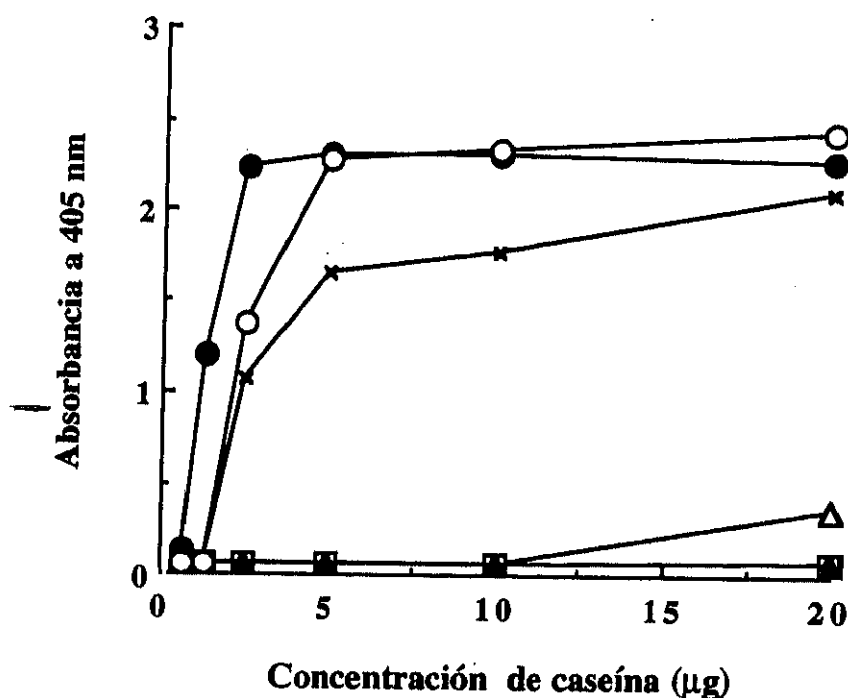


Figura IV.7. ELISA Indirecto de las fracciones caseínicas purificadas por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando anticuerpos biotinizados específicos frente a las caseínas totales de la leche de cabra (anti-CC). Fracción 1 (Δ, caseína β), fracción 2 (▲, caseína κ), fracción 4 (x, caseína α_{s1} con residuos de β y κ), fracción 5 (○, caseína α_{s2}), caseínas totales de oveja (□) y caseínas totales de cabra (●).

sangre y el suero obtenido se analizó por la técnica del ELISA Indirecto frente a los extractos antigénicos de interés (CC, CV y CO); después de comprobar que ninguno de los conejos presentaba reactividad inmunológica frente a dichos extractos antigénicos, los animales se consideraron aptos para su inmunización.

Durante la inmunización de los conejos, se realizaron tres sangrías parciales para comprobar si producían anticuerpos frente a las caseínas de cabra, así como para detectar si existían o no reacciones cruzadas con las caseínas de otras especies animales. En la sangría parcial, efectuada a los 48 días de la primera inoculación, ya se detectó una reacción inmunológica significativa de los inmunosueros anti-caseína α_{S2} frente a sus respectivos extractos antigénicos. En las sangrías realizadas a los 68 y 80 días, se apreció un incremento significativo de la respuesta inmunológica de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés y, por ello, a los 115 días de iniciar el proceso de inmunización se efectuó la sangría final.

Los inmunosueros procedentes de la sangría final se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico y empleando un ELISA Indirecto, se evaluó su potencial de discriminar las caseínas de la leche de cabra, vaca y oveja, utilizando como antígenos 20 μ g de las caseínas totales de estas leches, los inmunosueros purificados a diferentes diluciones (1/1000 a 1/64000 v/v en tampón PBST) y, como conjugado uno comercial de anti- inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cerdo y conjugadas al enzima peroxidasa de rábano a la dilución 1/1500 (v/v) en tampón PBST.

En la tabla IV.1. se muestra la actividad del inmunosero obtenido de conejos frente a la fracción que contiene la caseína α_{S2} de la leche de cabra, observándose que los anticuerpos utilizados reconocen a todos los extractos antigénicos y por tanto son incapaces de discriminar las caseínas de la leche de cabra de las de vaca y oveja.

IV.4. OBTENCION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para la obtención de anticuerpos monoclonales, comenzamos la inmunización de ratones Balb/c de ocho semanas de edad, con la caseína α_{S2} de la leche de cabra purificada por cromatografía de intercambio catiónico. Como en el caso de los conejos, a los ratones se les extrajo una muestra de sangre antes de comenzar la inmunización y el suero se analizó por un ELISA Indirecto frente a 20 μ g de los extractos antigénicos CC, CV y CO. Ninguno de los animales manifestó reactividad inmunológica frente a dichos extractos, por lo que se

Tabla IV.1. Actividad del inmunosuero obtenido de conejos frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra, utilizando un ELISA Indirecto

DILUCIONES INMUNOSUERO	CASEINAS TOTALES (20 μ g)		
	CABRA	VACA	OVEJA
1 / 1000	2,854*	2,775	2,854
1 / 2000	2,824	2,744	2,824
1 / 4000	2,598	1,720	2,407
1 / 8000	1,907	1,141	1,700
1 / 16000	1,416	0,838	1,236
1 / 32000	0,951	0,604	0,849
1 / 64000	0,579	0,375	0,479

* Densidad óptica a 405 nm

consideraron aptos para su inmunización. Durante la inmunización de los ratones también se realizaron sangrías parciales. En la primera de ellas, efectuada a los 25 días, ya se apreció inmunoreactividad de los animales frente a las CC, incrementándose ésta en la segunda y terceras sangrías, realizadas a los 40 y 55 días respectivamente del comienzo de la inmunización, por lo que procedimos a realizar la fusión celular a los 60 días de la primera inoculación.

IV.4.1. FUSION CELULAR

El bazo del ratón con el título mayor de anticuerpos frente a las caseínas de la leche de cabra (Figura IV.8.), se utilizó para la fusión de los linfocitos con las células de mieloma (P3X63-Ag 8.653). A las 24 horas de realizada la fusión se comenzó la selección de los hibridomas con el medio HAT y, a los 7 días, ya se observaban los primeros hibridomas al microscopio. A los 15 días, se evaluó la capacidad de los sobrenadantes de los hibridomas para reconocer a las caseínas de la leche de cabra mediante un ELISA Indirecto. Las condiciones de este ensayo preliminar fueron:

- Antígeno: 20 µg del extracto antigénico CC/pocillo
- Anticuerpo: sobrenadantes de cultivo de los hibridomas (dilución 1/1)
- Conjugado: uno comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenido de conejo y marcado con el enzima peroxidasa de rábano a la dilución 1/1500 (v/v) en tampón PBST

De este estudio determinamos que la eficiencia de la fusión celular (número de pocillos que mostraban crecimiento de hibridomas/número total de pocillos utilizados) fue mayor del 50%. Asimismo, de 400 pocillos que mostraban crecimiento de hibridomas, el 25% producían anticuerpos frente a las caseínas de la leche de cabra.

IV.4.2. SELECCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DE INTERES

Los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron también mediante un ELISA Indirecto frente a los extractos antigénicos CO y CV (20 µg), para determinar su especificidad. Este segundo estudio determinó la existencia de 8 líneas celulares que producían anticuerpos específicos frente a las caseínas de la leche de cabra y que no reconocían inmunológicamente a las caseínas de las leches de vaca y oveja. Estos 8 hibridomas fueron clonados por dilución límite, hasta obtener los subclones estabilizados denominados: A1H 11H (A1H), B2B 11C (B2B), C2H 11H (C2H), C6C 7G (C6C), C7G 2A (C7G), F4E 2E (F4E) y A6F 5D (A6F).

Por otra parte, la posible inmunidad cruzada de las 8 líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra, se examinó mediante un ELISA Indirecto, enfrentando los sobrenadantes celulares a 20 µg/pocillo de diferentes extractos antigénicos (Tabla IV.2.). De los resultados obtenidos, se deduce que los anticuerpos monoclonales analizados son monoespecíficos para las caseínas de la leche de cabra y no reconocen otras proteínas como las caseínas de la leche de vaca y oveja, extractos cárnicos (de cerdo, vaca, caballo y pollo), proteína de soja, gelatina y seroalbúmina bovina.

Estas 8 líneas celulares fueron seleccionadas para la producción en gran escala de anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra lo que se llevó a cabo de dos formas diferentes. Por una parte, se expandieron las líneas celulares mediante subcultivos celulares sucesivos de placas de 96 pocillos a placas de 48, 24 y 6 pocillos y a frascos de cultivo de 25 y 75 cm², hasta obtener aproximadamente 50 ml de los sobrenadantes. Al mismo tiempo, 2 líneas celulares (B2B y C2H) se utilizaron en inducción de tumores ascíticos en ratones Balb/c, recogiendo unos 2 ml de líquido ascítico de cada línea celular.

IV.4.3. CARACTERIZACION ISOTIPICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SELECCIONADOS

La caracterización inmunológica de la clase y subclase de los 8 anticuerpos monoclonales, se realizó utilizando un Kit comercial de Sigma con un antisuero comercial de conejo y mediante un ELISA Indirecto. Los resultados obtenidos indicaron que 6 hibridomas secretaban anticuerpos IgG1, mientras otros 2 (A1H y F4E) secretaban IgM.

IV.4.4. ACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SELECCIONADOS, FRENTE A LAS CASEINAS DE LA LECHE DE CABRA UTILIZANDO UN ELISA INDIRECTO

Para determinar la especificidad y reactividad de los 8 anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de las líneas celulares y de los líquidos ascíticos, se desarrolló un ELISA Indirecto, en el que las condiciones del ensayo fueron:

- Antígeno: 20 µg de las caseínas de la leche de cabra (CC)/pocillo
- Anticuerpos monoclonales: los sobrenadantes de las 8 líneas celulares y los 2 líquidos ascíticos a diferentes diluciones (1/8000 a 1/12800) (v/v) en PBST
- Conjugado: uno comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas de conejo y marcadas con la enzima peroxidasa de rábano, a la dilución 1/1500 (v/v) en PBST.

Tabla IV.2. Inmunidad Cruzada frente a diversos Antígenos de los Anticuerpos Monoclonales Obtenidos frente a las Caseínas de la Leche de Cabra, utilizando un ELISA Indirecto

Proteínas	ANTICUERPOS MONOCLONALES							
	A1H	B2B	B12B	C2H	C6C	C7G	F4E	A6F
Caseínas								
Cabra	2,167*	2,152	2,156	2,593	2,577	2,769	2,577	2,593
Oveja	0,131	0,142	0,154	0,151	0,133	0,250	0,164	0,280
Vaca	0,124	0,117	0,117	0,149	0,129	0,170	0,164	0,229
Extractos cárnicos								
Cerdo	0,157	0,123	0,129	0,190	0,138	0,180	0,167	0,190
Vaca	0,136	0,109	0,141	0,153	0,122	0,167	0,164	0,211
Caballo	0,139	0,119	0,184	0,196	0,123	0,177	0,165	0,290
Pollo	0,130	0,159	0,152	0,195	0,151	0,154	0,159	0,221
Soja	0,123	0,194	0,169	0,192	0,146	0,170	0,142	0,250
Gelatina	0,130	0,120	0,128	0,141	0,132	0,143	0,140	0,188
Seroalbúmina bovina	0,115	0,142	0,125	0,175	0,132	0,155	0,125	0,181

* Densidad óptica a 405 nm

En la Figura IV.9. se muestran los resultados obtenidos y de su análisis es posible afirmar que de los 8 anticuerpos monoclonales obtenidos de los sobrenadantes de las líneas celulares, 3 de ellos (B2B, B12B y C2H) son los más reactivos (1/3200 B2B, 1/1600 B12B y 1/1600 C2H), mientras que de los 2 líquidos ascíticos obtenidos, el B2B (1/10000) fue el de mayor actividad. De esta forma, nuestro trabajo continuó con la selección de los 3 anticuerpos monoclonales que mostraban la mayor reactividad inmunológica a partir de los sobrenadantes celulares (B2B, B12B y C2H) y uno del líquido ascítico (B2B).

Los tres anticuerpos monoclonales seleccionados se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico y se determinó su concentración de proteína, según el método descrito por Harlow y Lane (1988), obteniendo los siguientes resultados:

Anticuerpo monoclonal	Concentración de proteína (mg/ml)
Líquido Ascítico B2B	0,49
Sobrenadante C2H	0,99
Sobrenadante B12B	0,98
Sobrenadante B2B	1,19

Una vez purificados y para determinar si la purificación parcial por sulfato amónico había influido en su actividad inmunológica, realizamos un ELISA Indirecto con las mismas condiciones que el realizado con los anticuerpos sin purificar (Figura IV.9.). De los resultados de la Figura IV.10., se comprueba que los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales sin purificar y purificados son los mismos, lo que significa que su purificación parcial por sulfato amónico no reduce su actividad.

El siguiente paso fue la determinación de la actividad de los 4 anticuerpos monoclonales seleccionados, frente a la leche cruda de cabra. Para ello se realizó un ELISA Indirecto utilizando como antígeno leche cruda de cabra a la dilución 1/200 (v/v) en tampón PBS, los sobrenadantes de cultivo y el líquido ascítico a diferentes diluciones (1/800 a 1/12800, v/v en tampón PBST) y el conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón a la dilución 1/1500 (v/v) en PBST. De los datos obtenidos (Figura IV.11.), se desprende que de los 4 anticuerpos monoclonales estudiados, los más inmunoreactivos frente al extracto antigénico de la leche cruda de cabra fueron el sobrenadante del cultivo y el líquido ascítico del hibridoma B2B. Por esta razón, el Ac_m B2B presente en el sobrenadante del cultivo celular y en el líquido ascítico, fue seleccionado para continuar con él nuestro trabajo.

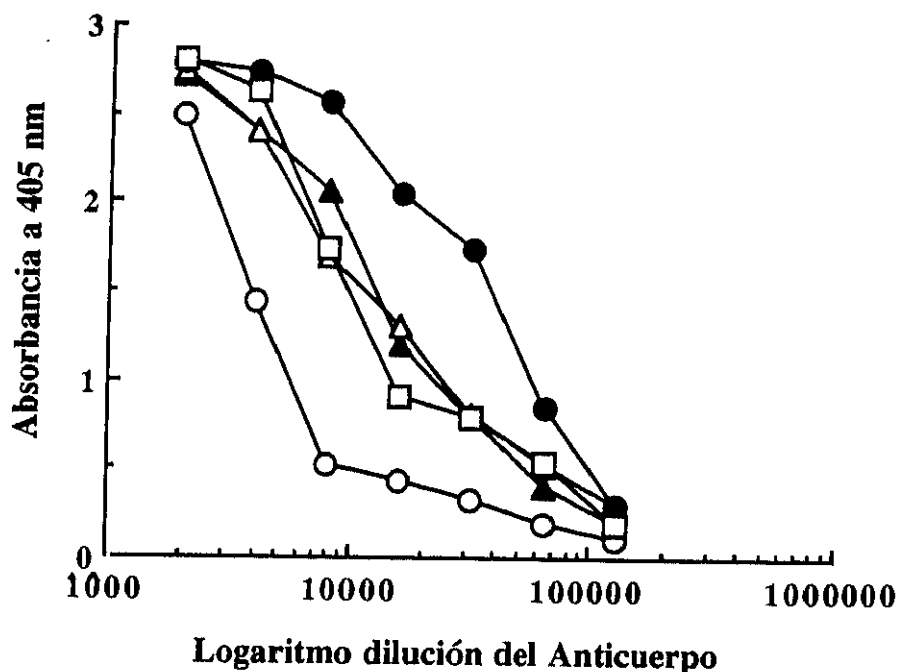


Figura IV.8. Reactividad de los inmunosueros de los cinco lotes de ratones inmunizados, frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra y utilizando un ELISA Indirecto. Lote 1 (□), lote 2 (▲), lote 3 (○), lote 4 (◻) y lote 5 (■).

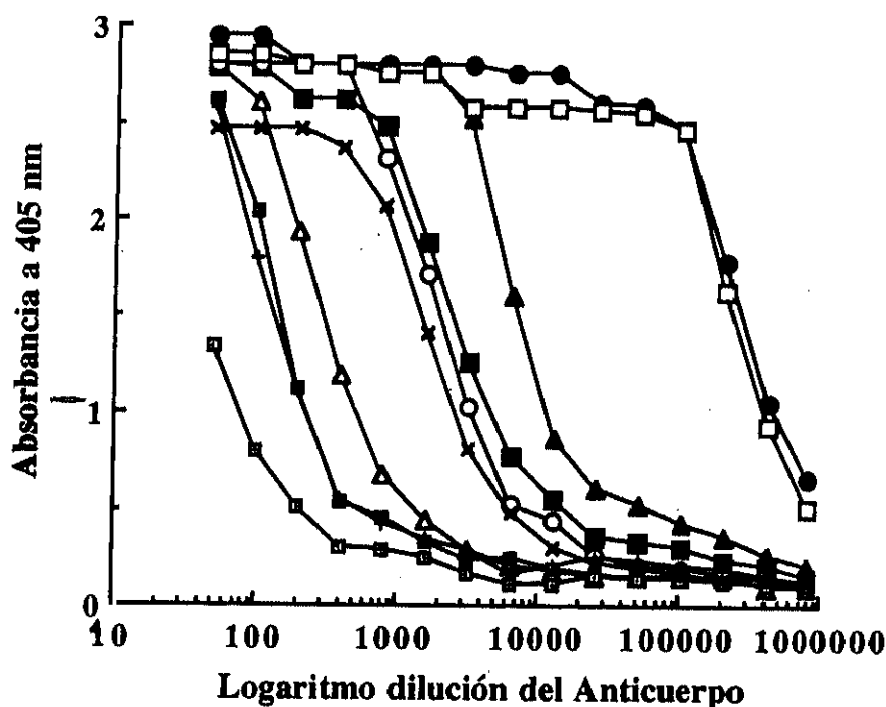


Figura IV.9. Reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos de los sobrenadantes de las líneas celulares A1H (Δ), B12B (■), B2B (▲), C2H (○), C6C (+), F4E (■), C7G (■) y A6F (×) y de los líquidos ascíticos B2B (●) y C2H (□), frente a las caseínas de la leche de cabra, utilizando un ELISA Indirecto.

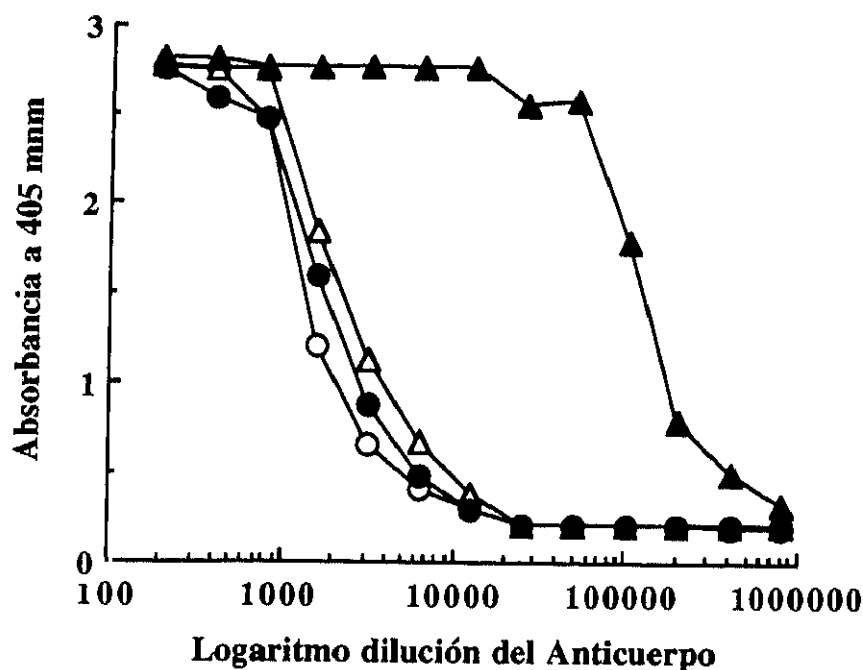


Figura IV.10. Reactividad de los anticuerpos monoclonales purificados de los sobrenadantes de las líneas celulares B12B (○), B2B (Δ) y C2H (●) y del líquido ascítico B2B (▲), frente a 20 μg de las caseínas de la leche de cabra, utilizando un ELISA Indirecto.

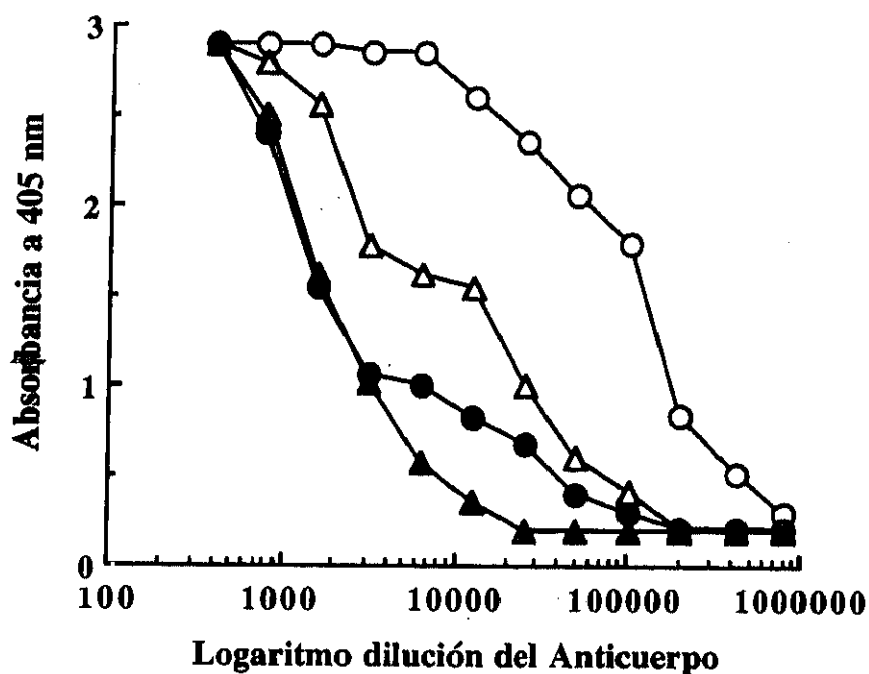


Figura IV.11. Reactividad de los anticuerpos monoclonales purificados de los sobrenadantes de las líneas celulares B12B (▲), B2B (Δ) y C2H (●) y del líquido ascítico B2B (○), frente a la leche de cabra (dilución 1/200), utilizando un ELISA Indirecto.

IV.4.5. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD Y ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL B2B

En la Tabla IV.3. se muestran los valores de absorbancia a 405 nm del Ac_m B2B, procedente tanto del líquido ascítico como del sobrenadante del cultivo celular a diferentes diluciones (1/800 a 1/12800, v/v en tampón PBST), frente a las caseínas de la leche de cabra, oveja y vaca (20 μ g/ 100 μ l en tampón PBS) y frente a la leche cruda de cabra, oveja y vaca (dilución 1/200 v/v en tampón PBST). De los resultados obtenidos, se deduce que la especificidad del anticuerpo monoclonal del sobrenadante celular, frente a las caseínas y la leche cruda de cabra, es mayor que la que presenta en el líquido ascítico. Debido a esta mayor especificidad, elegimos el sobrenadante celular del cultivo del hibridoma B2B, para continuar nuestro trabajo de investigación.

Debido a que el objetivo de nuestro trabajo era detectar la leche de cabra, tanto en mezclas frescas como en quesos madurados, el siguiente paso en nuestra investigación consistió en evaluar la actividad del Ac_m B2B frente a la leche de cabra sometida a los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización (dilución 1/200 v/v en tampón PBS). De los resultados de la Tabla IV.4., se deduce que la actividad del Ac_m B2B frente a la leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra fue prácticamente la misma, lo que indica que la actividad de dicho anticuerpo monoclonal es constante frente a las diferentes temperaturas de procesamiento de la leche de cabra.

Finalmente, la especificidad del Ac_m B2B frente a las caseínas de la leche de cabra, oveja y vaca, así como frente a las caseínas (β , κ , α_{s1} y α_{s2}) de la leche de cabra purificadas por cromatografía de intercambio catiónico (20 μ g/100 μ l en PBS), se determinó por la técnica de inmunoblotting. La dilución del Ac_m B2B empleada fue la 1/1000 (v/v) en tampón PBST. De los resultados obtenidos (Figura IV.12.), se deduce que el Ac_m B2B es monoespecífico frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra.

Debido a la especificidad del Ac_m B2B purificado, frente a la caseína de la leche de cabra, se decidió utilizarlo en la detección y cuantificación de la presencia de leche de cabra en mezclas lácteas frescas y quesos madurados, mediante el desarrollo y puesta a punto de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) adecuadas.

Tabla IV.3. Especificidad del Anticuerpo Monoclonal B2B del Líquido Ascítico y del Sobrenadante del Cultivo Celular, frente a la Leche y Caseínas de Diversas Especies Animales utilizando un ELISA Indirecto

ANTICUERPO MONOCLONAL B2B	DILUCIONES	CASEINAS (20µg/100µl)			LECHE CRUDA (1/200)		
		<u>Cabra</u>	<u>Oveja</u>	<u>Vaca</u>	<u>Cabra</u>	<u>Oveja</u>	<u>Vaca</u>
<u>Líquido Ascítico</u>	1/800	2,766*	0,900	0,363	2,832	0,939	0,371
	1/1600	2,772	0,819	0,272	2,785	0,806	0,294
	1/3200	2,781	0,737	0,257	2,782	0,639	0,226
	1/6400	2,784	0,651	0,191	2,602	0,502	0,217
	1/12800	2,564	0,558	0,125	2,589	0,412	0,155
<u>Sobrenadante Cultivo</u> <u>Celular</u>	1/800	2,766	0,158	0,150	2,766	0,168	0,149
	1/1600	2,609	0,139	0,147	2,602	0,191	0,156
	1/3200	2,353	0,124	0,104	1,837	0,158	0,137
	1/6400	1,767	0,102	0,110	1,210	0,154	0,141
	1/12800	1,162	0,102	0,100	0,747	0,146	0,138

*Densidad óptica a 405 nm

Tabla IV.4. Actividad del Anticuerpo Monoclonal B2B frente a la Leche de Cabra Sometida a Diferentes Tratamientos Térmicos, utilizando un ELISA Indirecto

DILUCIONES B2B	LECHE DE CABRA (1/200)		
	Cruda	Pasteurizada	Estérilizada
1/400	2,773*	2,782	2,765
1/800	2,766	2,773	2,767
1/1600	2,602	2,766	2,484
1/3200	1,837	1,962	2,041
1/6400	1,210	1,222	1,308
1/12800	0,747	0,812	0,889

* Densidad óptica a 405 nm

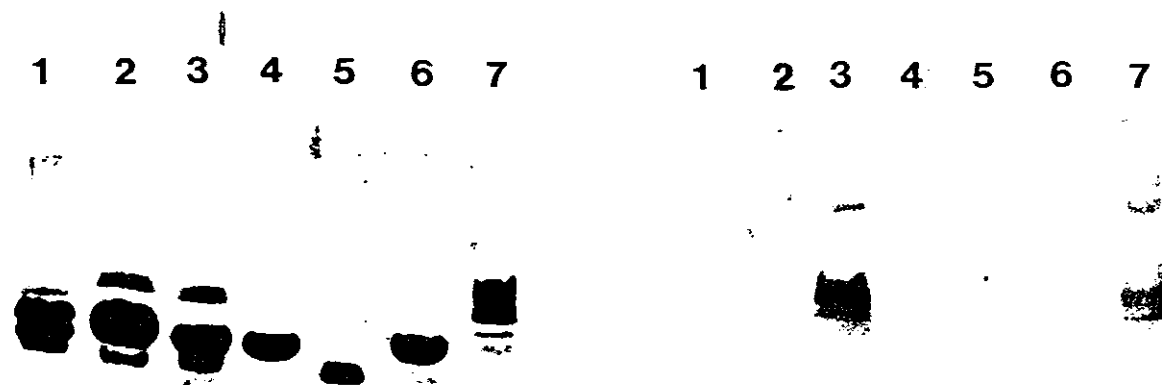


Figura IV.12. Especificidad del anticuerpo monoclonal B2B frente a caseínas fraccionadas por SDS-PAGE y transferidas a papel de nitrocelulosa. Línea 1, caseínas de la leche de vaca; línea 2, caseínas de la leche de oveja; línea 3, caseínas de la leche de cabra; fracciones caseínicas purificadas por cromatografía de intercambio catiónico: caseína β (línea 4), caseína K (línea 5), caseína α_{s1} (línea 6) y caseína α_{s2} (línea 7).

IV.5. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN MEZCLAS LACTEAS, UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

El Ac_m B2B parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico, se utilizó en las técnicas de ELISA Indirecto, Sandwich y Competitivo para determinar la presencia de la leche de cabra cruda y de la sometida a tratamientos térmicos en mezclas lácteas con leches frescas de oveja y vaca.

Como se describe en la sección III.2.1.2. de esta memoria, se utilizaron tres mezclas experimentales independientes de leche de cabra en leche de oveja, y de leche de cabra en leche de vaca, dependiendo del origen de la leche de cabra. De cada mezcla, se realizaron 6 ensayos independientes para, posteriormente, realizar estudios estadísticos utilizando el programa "Statview" y representar los valores medios obtenidos en forma de recta patrón. Cada punto de la recta patrón representa, por lo tanto, la media de los valores de absorbancia a 405 nm de las seis experiencias independientes realizadas con cada mezcla.

IV.5.1. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE CRUDA DE CABRA EN LA LECHE CRUDA DE OVEJA

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

Las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en los ensayos, se determinaron tras varias experiencias preliminares y siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.8.1. de esta memoria. Los resultados obtenidos indicaron que la dilución más apropiada del Ac_m B2B era la 1/1000 (v/v) en tampón PBST, mientras que la del conjugado de antiinmunoglobulinas de ratón obtenidas de conejo y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano fue la 1/1500 (v/v) en tampón PBST. Como antígeno se utilizaron las tres mezclas lácteas experimentales realizadas a la dilución 1/25 (v/v) en tampón PBS, con los porcentajes de sustitución de 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 15% de leche cruda de oveja por leche cruda de cabra.

La Figura IV.13., muestra los valores medios de la absorbancia a 405 nm, de las tres mezclas experimentales procedentes de 6 ensayos diferentes. Utilizando esta técnica y los reactivos descritos, es posible cuantificar la sustitución de un 0,5 a un 15% de leche cruda de oveja por leche cruda de cabra, mediante la ecuación: $A_{405} = 0,3505 + 0,1138 x$, cuyo

coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,996$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,996$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de cabra por leche de oveja. Aunque la recta patrón nos permite cuantificar del 0,5 al 15% de sustitución, los valores de absorbancia para los porcentajes de sustitución menores (0,5-2,5%) son pequeños y poco significativos, por lo que decidimos intentar mejorar estos resultados utilizando otra técnica inmunoenzimática.

B. TECNICA DEL ELISA SANDWICH

En la desarrollo de esta técnica inmunoenzimática se utilizaron varios modelos experimentales. El primero de ellos utilizaba el inmunosuero anti-CC obtenido de conejos y el Ac_m B2B, ambos purificados parcialmente por precipitación con sulfato amónico, del que se realizaron dos variantes, una que tenía como anticuerpo de captura al Ac_m B2B y como anticuerpo de detección al inmunosuero anti-CC y, otra, en la que se invirtieron las posiciones, es decir, como anticuerpo de captura el inmonusuero anti-CC y como anticuerpo de detección el monoclonal B2B. Los resultados obtenidos (no mostrados), indicaron que este sistema de ELISA Sandwich, no discriminaba la leche de cabra de la leche de oveja.

Para el segundo modelo, utilizamos dos anticuerpos monoclonales (B2B y B12B) y como en el caso anterior, se realizaron varios experimentos intercambiando las posiciones de los anticuerpos de captura y de detección. Los resultados obtenidos (no mostrados), de este segundo modelo tampoco permitieron discriminar entre las leches de cabra y oveja, ya que incluso la leche de oveja sin nada de cabra muestra una absorbancia a 405 nm de 0,5 y 0,6, no existiendo diferencias entre los porcentajes de mezcla más bajos y los más altos.

Los resultados de las experiencias descritas en este apartado permiten concluir que las técnicas del ELISA Sandwich desarrollados no mostraron su utilidad en la detección de leche de cabra en la de oveja.

C. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

Dada la ineficacia del ELISA Sandwich y con el fin de mejorar los resultados obtenidos con la técnica del ELISA Indirecto, se procedió al desarrollo y puesta a punto un ELISA Competitivo.

En primer lugar, se determinaron las concentraciones idóneas de los reactivos

utilizados en los ensayos. Después de varios ensayos preliminares, se establecieron las condiciones óptimas de trabajo, que fueron:

- Antígeno: como antígeno se utilizaron 20 µg/pocillo de las caseínas totales de cabra liofilizadas (extracto antigénico CC).

- Muestras problema: las tres mezclas de leche experimentales realizadas, a la dilución 1/200 en tampón PBST (v/v) en tampón PBST en los diferentes porcentajes de sustitución de leche de oveja por leche de cabra.

- Anticuerpo: el monoclonal B2B, parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico a la dilución 1/1000 (v/v) en tampón PBST.

- Conjugado: uno comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas de conejo y conjugadas al enzima peroxidasa de rábano, diluido a la 1/1500 (v/v) en tampón PBST.

Los resultados obtenidos con el ELISA Competitivo (Figura IV.14.) se muestran en función del % de Inhibición, calculado a partir de los valores de la absorbancia obtenidos a 405 nm, de la siguiente manera:

$$\% A_{405} = \frac{B \text{ (valor de la } A_{405} \text{ en cada punto)}}{B_0 \text{ (valor de la } A_{405} \text{ del 0\% de mezcla)}} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% A_{405}$$

Los estudios estadísticos se realizaron del mismo modo que en el ELISA Indirecto, por lo que cada punto de la gráfica representa la media del porcentaje de inhibición de seis experiencias distintas, con cada una de las tres mezclas experimentales. Con esta técnica es posible detectar y cuantificar la sustitución de un 0,25% a un 15 % de leche de oveja por leche de cabra, utilizando la ecuación de regresión logarítmica: $\log A_{405} = 0,0383 - 0,3831 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,976$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,970$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche de cabra.

Comparando estos resultados con los obtenidos con el ELISA Indirecto, se observa

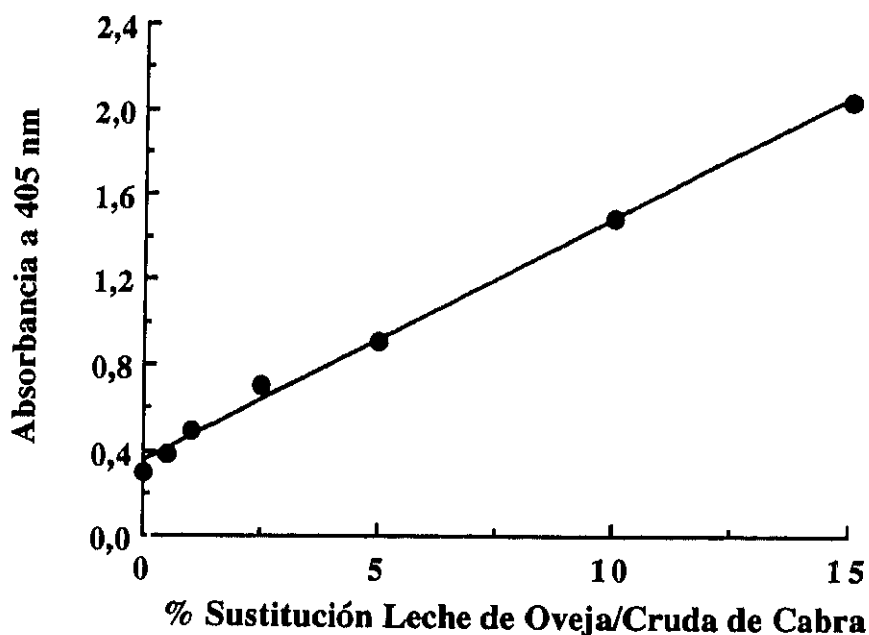


Figura IV.13. Detección de leche cruda de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

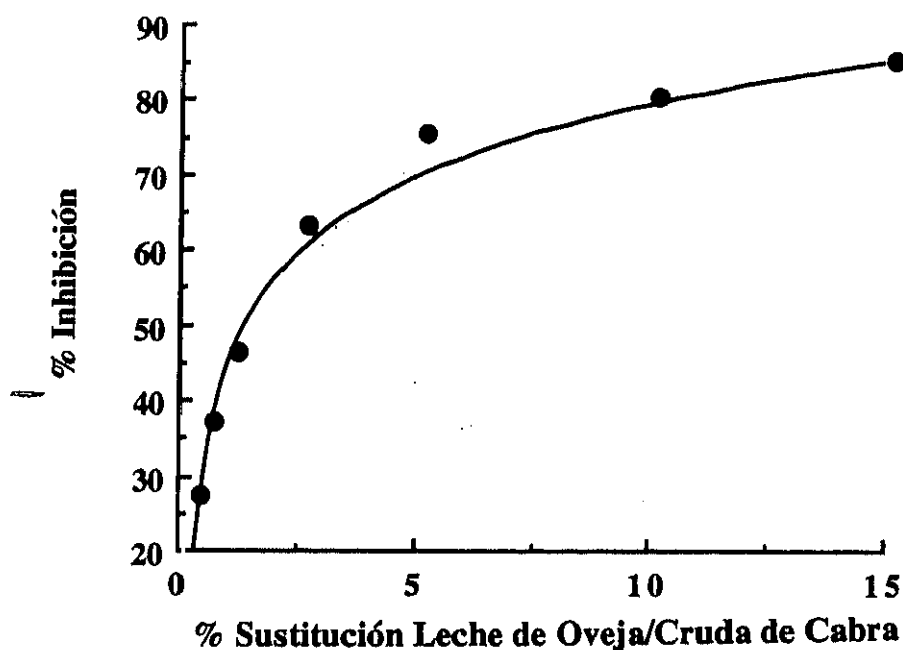


Figura IV.14. Detección de leche cruda de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

que la técnica del ELISA Competitivo permite detectar y cuantificar porcentajes de mezcla mucho más bajos, ya que para sustituciones del 0,25% se aprecia ya un porcentaje de Inhibición superior al 25%, de lo que se deduce que la sensibilidad de este ensayo es mucho mayor que el del ELISA Indirecto.

D. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO UTILIZANDO EL SISTEMA DE AMPLIFICACION BIOTINA-AVIDINA

En esta técnica el Ac_m B2B parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico, se conjugó a la biotina y la detección de los anticuerpos biotinizados unidos a sus antígenos específicos, se realizó empleando un conjugado de comercial estreptavidina-peroxidasa. Con el fin de poner a punto esta técnica se realizaron numerosos experimentos, aunque los resultados obtenidos (no mostrados), indicaron que la biotinización del Ac_m B2B originaba una disminución de su actividad para reconocer la leche de cabra en mezclas lácteas, por lo que se decidió utilizar las técnicas del ELISA Indirecto y Competitivo con los anticuerpos sin conjugar con la biotina en el resto de la investigación.

IV.5.2.DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE CRUDA DE CABRA EN LA LECHE CRUDA DE VACA

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

La metodología y los reactivos empleados en la detección de leche cruda de cabra en la leche cruda de vaca, fueron los descritos en la sección IV.5.1.A. La dilución del Ac_m fue la 1/1000 y la del conjugado la 1/1500. Como antígeno se utilizaron las tres mezclas lácteas experimentales a la dilución 1/25 (v/v) en tampón PBS, con los porcentajes de sustitución de 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 15% de leche cruda de vaca por leche cruda de cabra.

En la Figura IV.15. se muestran los valores de la absorbancia a 405 nm obtenidos con las tres mezclas experimentales utilizadas. Cada punto de la gráfica corresponde a los valores medios de los resultados de seis experiencias independientes. De los resultados obtenidos, se deduce que la técnica del ELISA Indirecto permite detectar la sustitución de un 0,5 a un 15% de leche de vaca en leche cruda de cabra, utilizando la ecuación de regresión lineal: $A_{405} = 0,4211 + 0,1122 x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,981$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,977$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche de cabra.

B. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

Con objeto de mejorar los resultados obtenidos con el ELISA Indirecto, para pequeños porcentajes de leche cruda de vaca por leche cruda de cabra, se procedió a la puesta a punto de un método de ELISA Competitivo. Para ello, se emplearon las diluciones de antígeno, anticuerpo y conjugado descritos en la sección IV.5.1.C. Las muestras problema fueron tres mezclas lácteas experimentales con diversos porcentajes de sustitución de lechefresca de vaca por leche cruda de cabra a la 1/200 en PBST (v/v).

La figura IV.16. muestra la relación entre el porcentaje de Inhibición de la absorbancia a 405 nm y el porcentaje de sustitución de la leche, calculados a partir de 6 ensayos con las 3 mezclas lácteas independientes. La absorbancia se relaciona con el porcentaje de inhibición como se describe en el apartado IV.5.1.C. y con el porcentaje de sustitución (0,25-15%), mediante la ecuación de regresión logarítmica: $\log A_{405} = 0,4290 - 0,3360 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,975$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,970$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche de cabra.

Con los resultados obtenidos es posible decir que, al igual que ocurría en la detección de leche cruda de cabra en leche de oveja, el ELISA Competitivo mejora sensiblemente la detección y cuantificación de leche cruda de cabra en leche de vaca.

IV.5.3. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN LECHE CRUDA DE OVEJA

Para determinar la posible influencia de los tratamientos térmicos en la detección y cuantificación de la leche de cabra en la leche de oveja, las muestras de leche cruda de cabra de la procedencia que se indica en la sección III.1.2.2., se sometieron a los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización descritos en la sección III.2.1.2.

Posteriormente, se prepararon las tres mezclas resultantes de cada tratamiento térmico (leche pasteurizada de cabra/leche cruda de oveja y leche esterilizada de cabra/leche cruda de oveja), las cuales se analizaron por las técnicas del ELISA Indirecto y ELISA Competitivo.

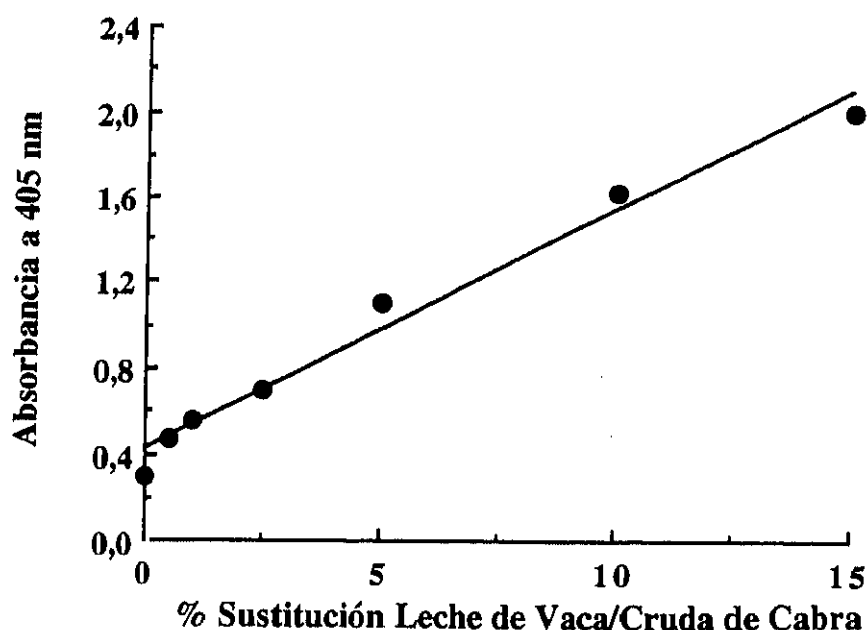


Figura IV.15. Detección de leche cruda de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

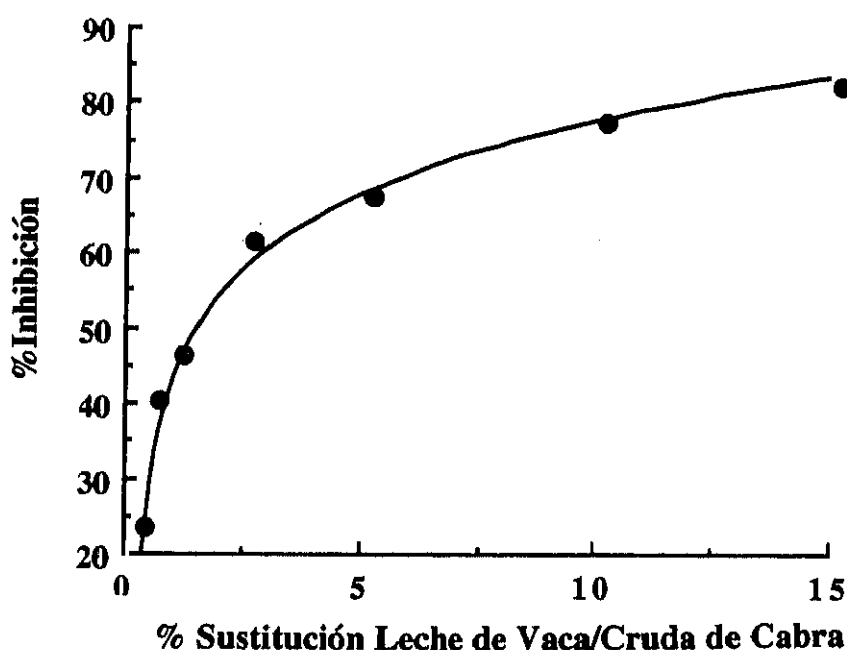


Figura IV.16. Detección de leche cruda de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

Utilizando el ELISA Indirecto descrito en la sección IV.5.1.A., se analizaron las tres mezclas que contenían 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 15% de sustitución de leche cruda de oveja /lech epasterizada de cabra y de las otras tres mezclas con los mismos porcentajes de sustitución leche cruda de oveja/ de leche esterilizada de cabra .

Las Figuras IV.17. y IV.18. muestran los resultados del ELISA Indirecto, para la detección y cuantificación de porcentajes de sustitución del 0,5 al 15% de leche cruda de oveja por leche pasteurizada (IV.17.) o esterilizada (IV.18.) de cabra. Las ecuaciones de regresión lineal, calculadas a partir de seis ensayos independientes con tres mezclas lácteas experimentales distintas, fueron las que se describen a continuación.

En el caso de la leche pasteurizada: $A_{405} = 0,131 + 0,4583 x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,983$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,979$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche pasteurizada de cabra. Para la leche esterilizada: $A_{405} = 0,3208 + 0,0955x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,966$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,960$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche esterilizada de cabra.

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que el ELISA Indirecto utilizado en la detección de leche pasteurizada o esterilizada de cabra en leche de oveja, permite cuantificar porcentajes de sustitución del 0,5 al 15%.

En la Figura IV.19. se muestran los valores de absorbancia con el ELISA Indirecto, para la detección y cuantificación de porcentajes de sustitución en el rango del 0,5 al 15% de leche de oveja por leche cruda, pasteurizada o esterilizada de cabra. De ellos se deduce, que la sensibilidad del ELISA Indirecto para detectar la presencia de leche pasteurizada de cabra en la de oveja es incluso mejor que para la leche cruda, disminuyendo ligeramente en las mezclas con leche esterilizada.

B. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

Las mezclas de leche pasteurizada y esterilizada de cabra con leche cruda de oveja, también se analizaron mediante la técnica del ELISA Competitivo descrito en la sección IV.5.1.C.

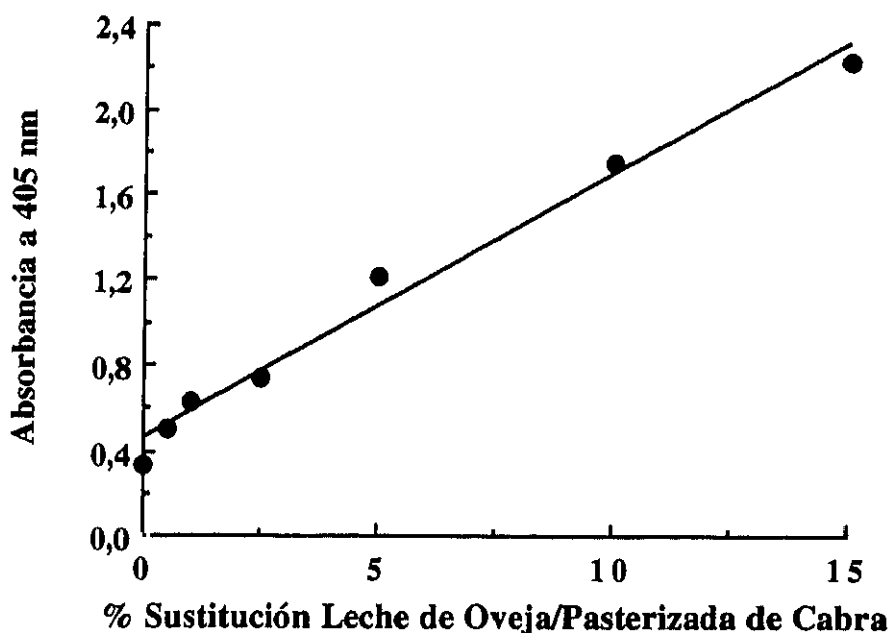


Figura IV.17. Detección de leche pasterizada de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

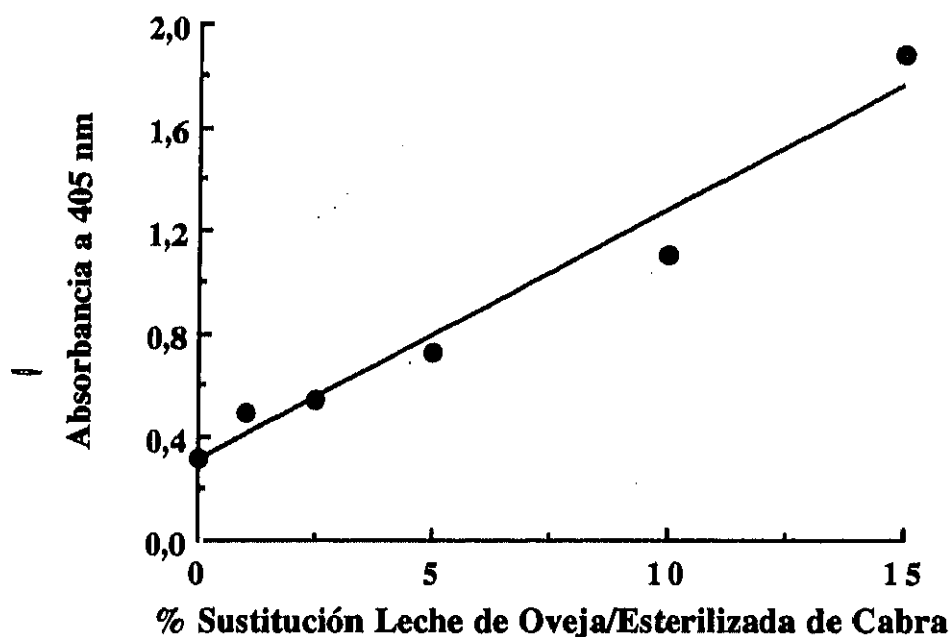


Figura IV.18. Detección de leche esterilizada de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

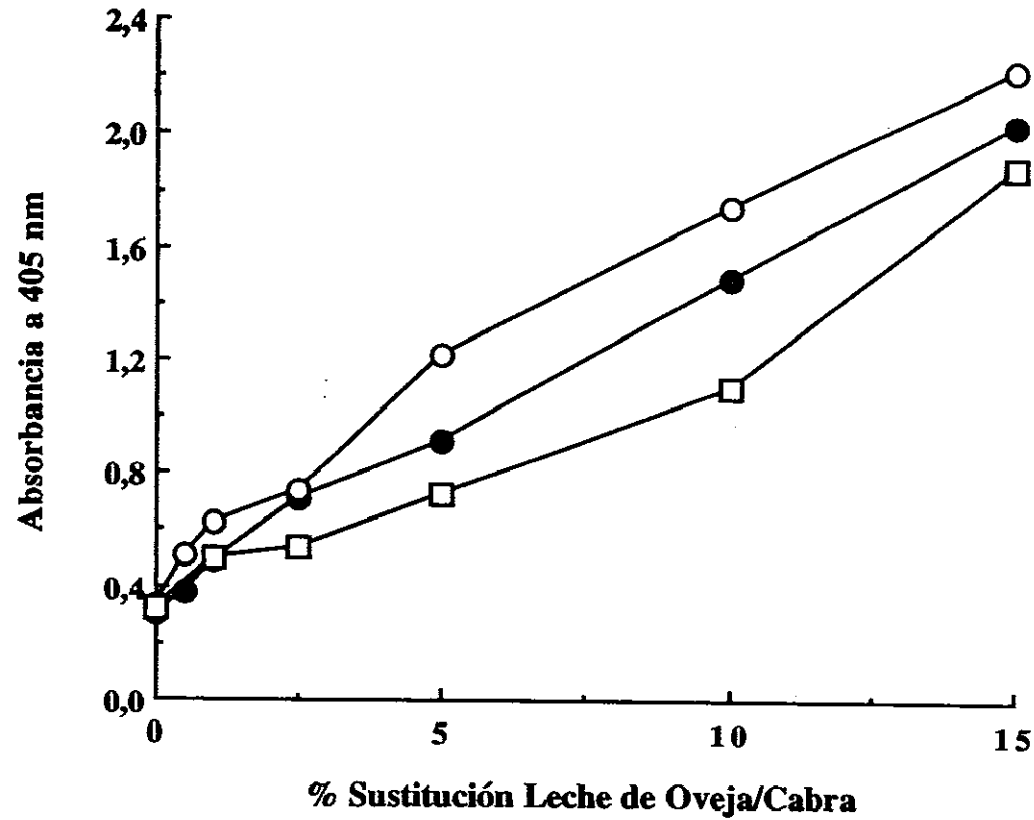


Figura IV.19. Detección de leche cruda (●), pasteurizada (○) y esterilizada (□) de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

Para las mezclas con leche pasteurizada de cabra (Figura IV.20.), la ecuación de regresión logarítmica obtenida para porcentajes de sustitución del 0,25 al 15% fue: $\log A_{405} = -0,0545 - 0,3807 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,976$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,971$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche pasteurizada de cabra.

En el caso de las mezclas con leche esterilizada (Figura IV.21.): $\log A_{405} = -0,0160 - 0,4044 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,983$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,980$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche esterilizada de cabra.

La representación de los porcentajes de inhibición obtenidos en la detección y cuantificación de la sustitución del 0,25 al 15% de leche de oveja por leche cruda, pasteurizada o esterilizada de cabra se muestran en la Figura IV.22. La sensibilidad del ELISA Competitivo no resulta afectada por los tratamientos térmicos a los que se somete la leche, aunque como en el ELISA Indirecto, en el caso de la leche esterilizada disminuye ligeramente. En cualquier caso, la sensibilidad del ELISA Competitivo es mejor que la del ELISA Indirecto, al igual que ocurría en la detección de la leche cruda de cabra en la leche de oveja.

IV.6.4. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN LECHE CRUDA DE VACA

Como en el caso de la leche de oveja, se realizaron mezclas de leche pasteurizada/esterilizada de cabra en leche cruda de vaca, con unos porcentajes de sustitución del 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, y 15% de una leche por otra, que se analizaron por las técnicas del ELISA Indirecto y Competitivo.

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

La metodología empleada, así como las concentraciones de los reactivos utilizados, fueron las mismas que las descritas en la sección IV.5.1.A.

En el caso de la leche pasteurizada (Figura IV.23.), la ecuación obtenida para la cuantificación de los porcentajes de sustitución del 0,5 al 15% de leche de vaca por leche pasteurizada de cabra fue: $A_{405} = 0,1246 + 0,4838 x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 =$

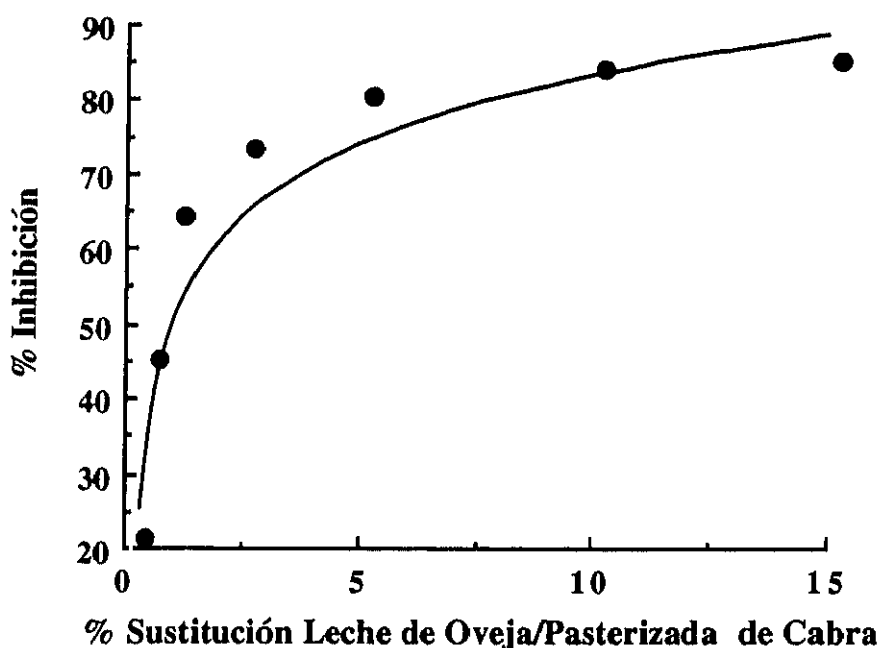


Figura IV.20. Detección de leche pasterizada de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

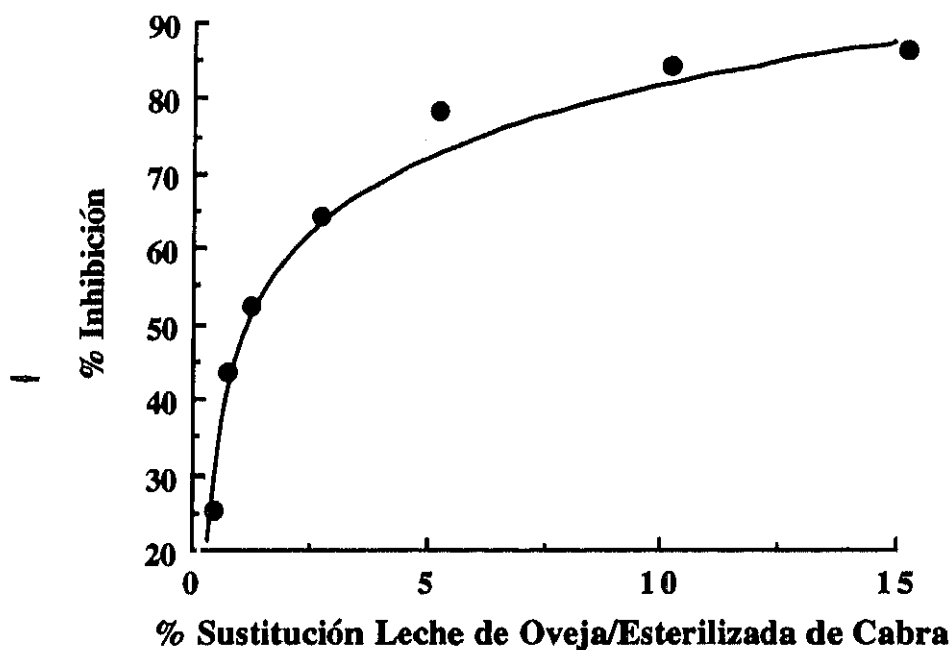


Figura IV.21. Detección de leche esterilizada de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

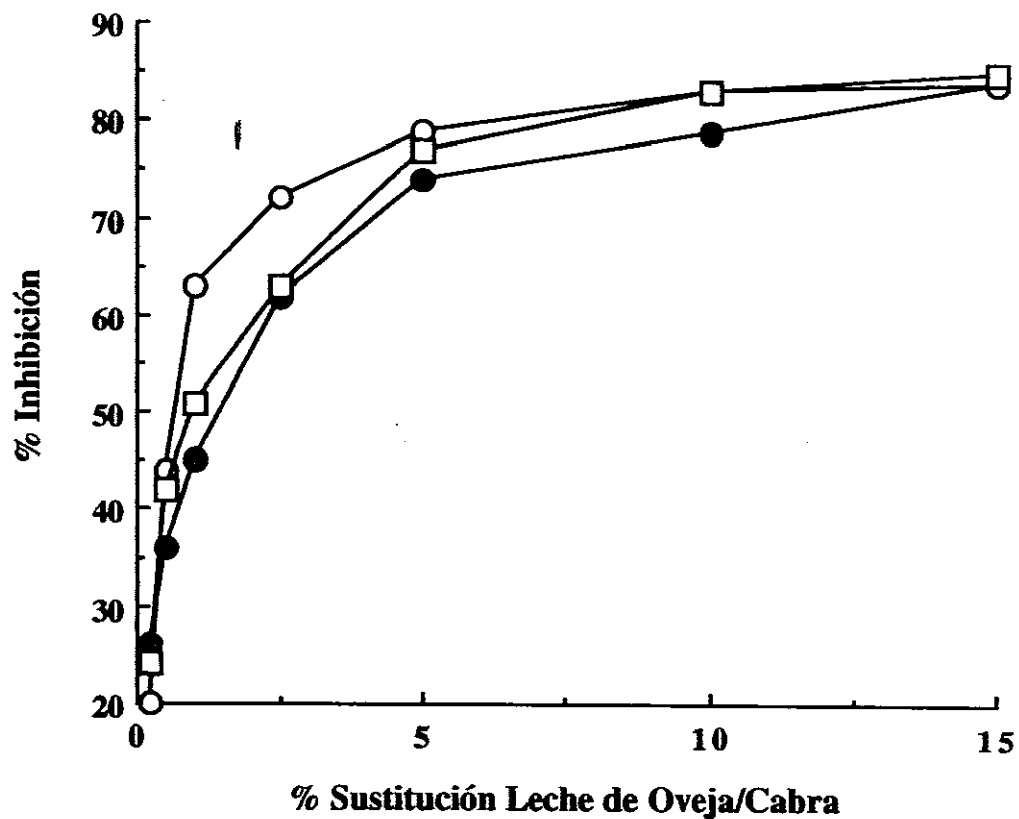


Figura IV.22. Detección de leche cruda (●), pasteurizada (○) y esterilizada (□) de cabra en leche de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

0,988 y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,986$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche pasteurizada de cabra.

Para la leche esterilizada (Figura IV.24.), la ecuación de cuantificación del 0,5 al 15 % de sustitución fue la siguiente: $A_{405} = 0,0966 + 0,2577 x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,993$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,992$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche esterilizada de cabra.

Los resultados obtenidos coinciden con los de las mezclas con leche de oveja, por lo que el ELISA Indirecto utilizado para la detección de leche pasteurizada o esterilizada de cabra en leche de vaca, permite cuantificar porcentajes de sustitución del 0,5 al 15%. En la Figura IV.25., se comparan los valores de absorbancia obtenidos con la técnica del ELISA Indirecto para la detección de leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra en leche de vaca. En este caso, se observa una gran disminución de la absorbancia con leche esterilizada debido, probablemente, a una mayor desnaturalización de las caseínas a la temperatura de esterilización, mientras que con la leche pasteurizada los valores son similares a los obtenidos con la leche cruda.

B. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

Las mezclas de leche pasteurizada y esterilizada de cabra con leche cruda de vaca, se analizaron mediante el ELISA Competitivo descrito en la sección IV.5.1.C.

En la Figura IV.26. se representan los resultados obtenidos para las mezclas con leche pasteurizada, siendo la ecuación de regresión logarítmica obtenida para la detección y cuantificación de porcentajes de sustitución del 0,5 al 15% la siguiente: $\log A_{405} = 0,0480 - 0,3465 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,974$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,970$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche pasteurizada de cabra.

Y para las mezclas con leche esterilizada (Figura IV.27.): $\log A_{405} = 0,0697 - 0,2991 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,978$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,974$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de leche de vaca por leche esterilizada de cabra.

La representación de los valores del % de inhibición obtenidos para la sustitución de un 0,25 a un 15% de leche de vaca por leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra se muestran en la Figura IV.28. De ella se deduce que, la sensibilidad del ELISA Competitivo

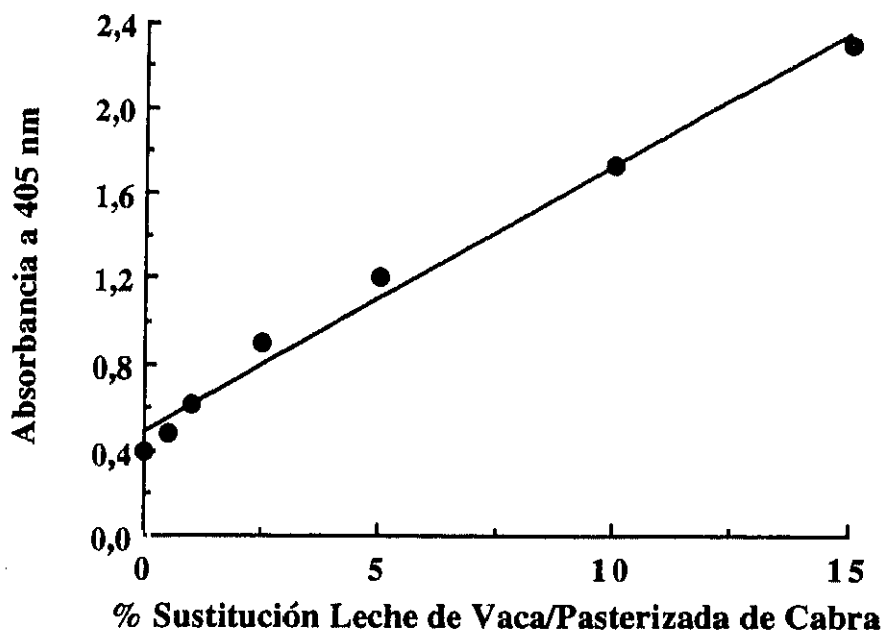


Figura IV.23. Detección de leche pasterizada de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

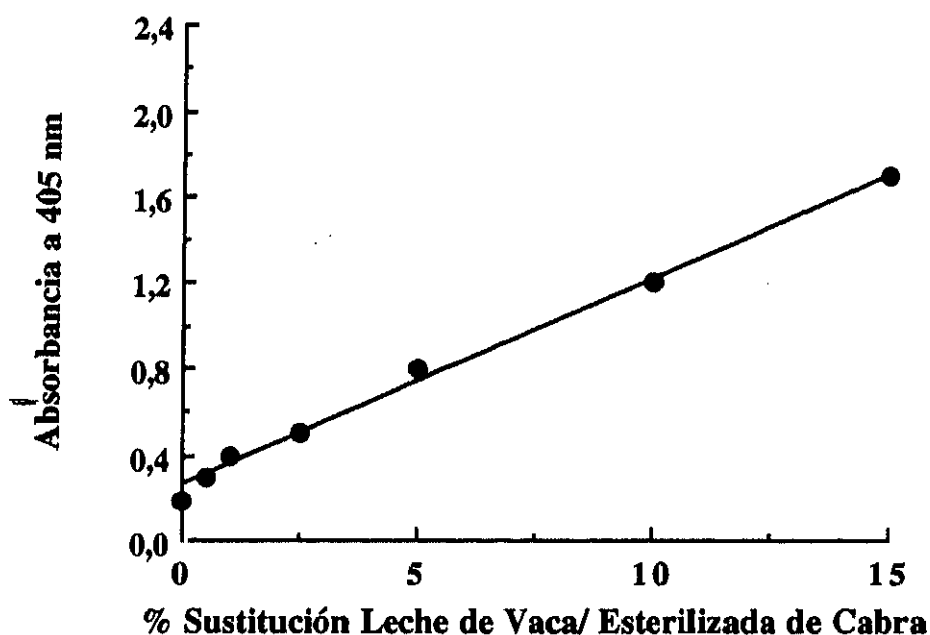


Figura IV.24. Detección de leche esterilizada de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

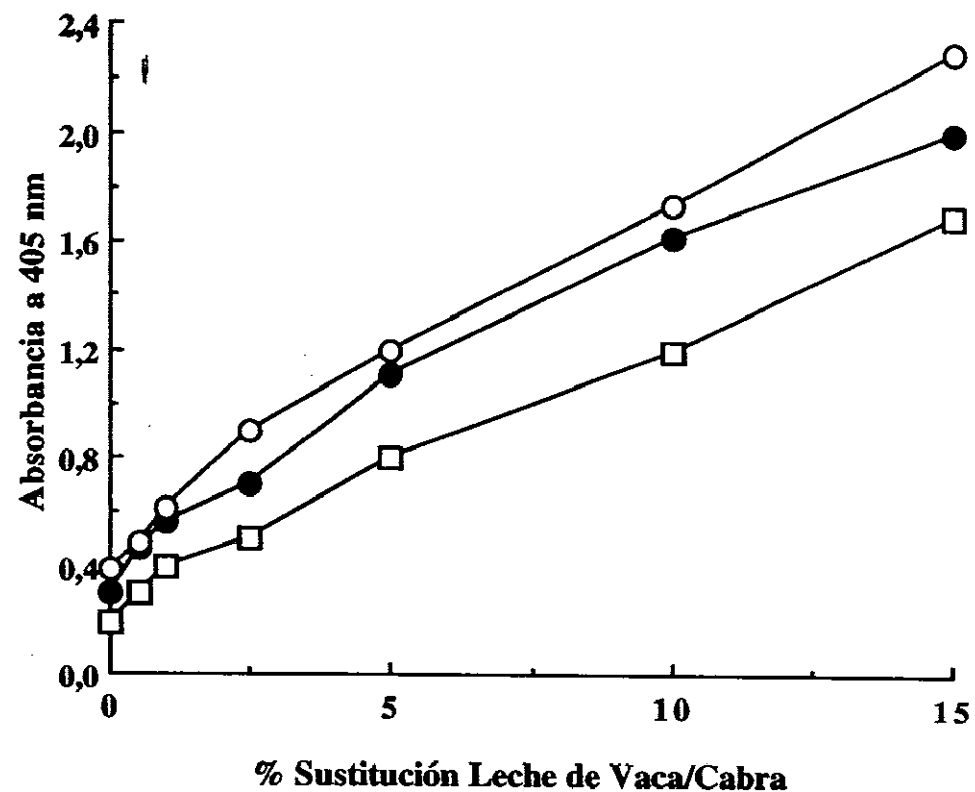


Figura IV.25. Detección de leche cruda (●), pasteurizada (○) y esterilizada (□) de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

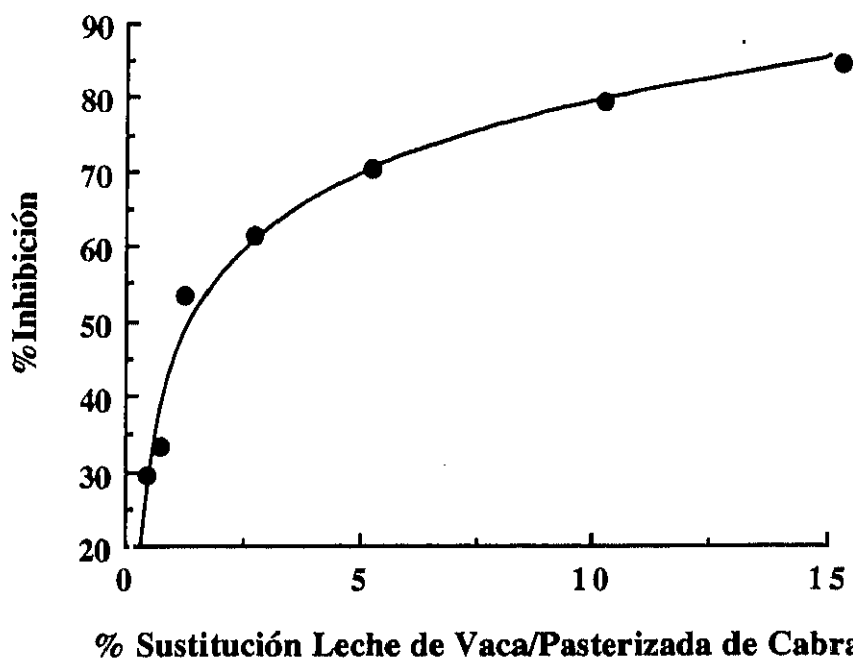


Figura IV.26. Detección de leche pasterizada de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

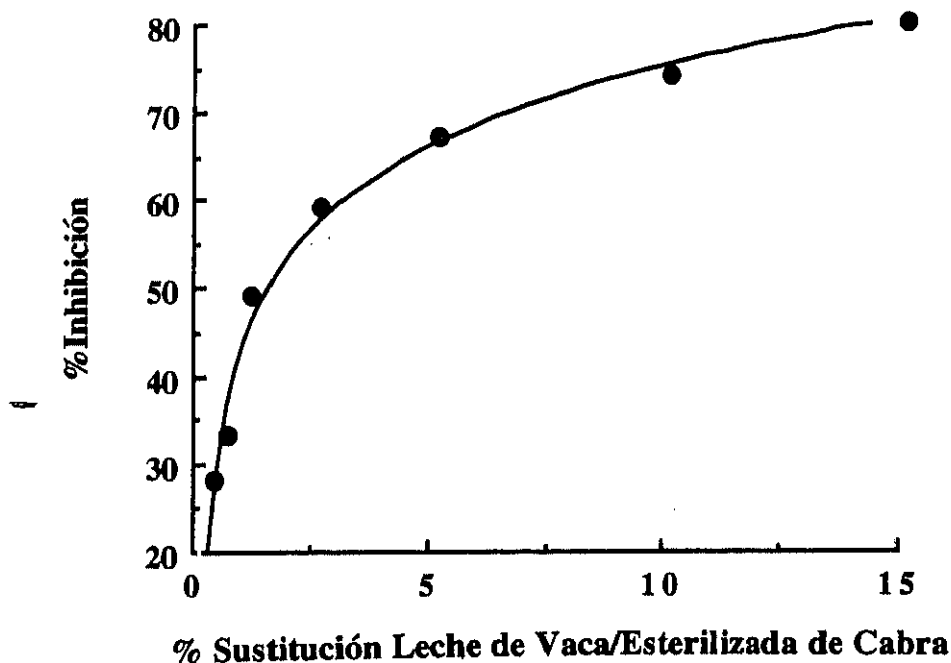


Figura IV.27. Detección de leche esterilizada de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

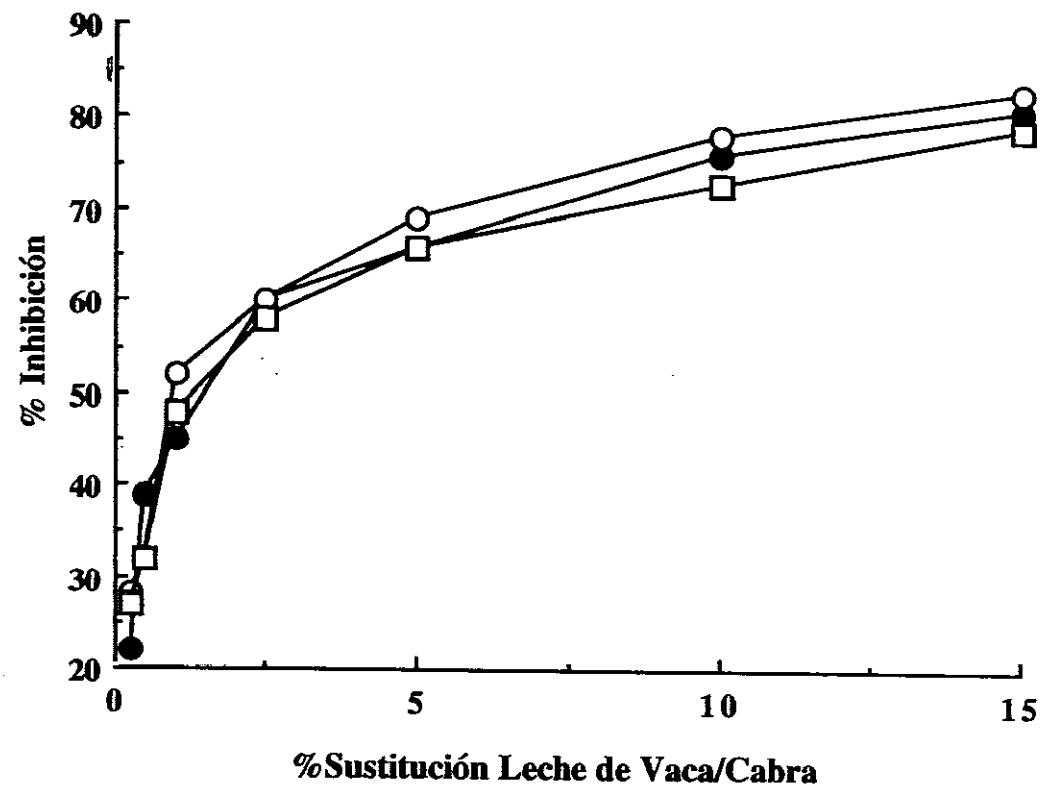


Figura IV.28. Detección de leche cruda (●), pasteurizada (○) y esterilizada (□) de cabra en leche de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes con 3 mezclas lácteas distintas.

no resulta afectada por los tratamientos térmicos a los que se somete la leche, permitiendo la detección y cuantificación de la sustitución de leche de vaca por la de cabra tratada térmicamente, con valores similares a los obtenidos para la leche cruda de cabra, incluso en el caso de la leche esterilizada.

IV.6. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA, EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y VACA, UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

En los trabajos desarrollados para la detección y cuantificación de leche de cabra en quesos madurados de oveja y vaca, se empleó el Ac_m B2B específico de las caseínas de la leche de cabra y parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico, así como las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA Indirecto y Competitivo. El procedimiento seguido fue similar al descrito con las mezclas lácteas, utilizándose tres tipos de queso de cabra, fresco, tierno y madurado, para determinar si el reconocimiento de las caseínas de la leche de cabra por el Ac_m B2B, se veía afectada por las transformaciones que sufren las caseínas durante la maduración del queso.

Las mezclas se realizaron con quesos de oveja (Roncal) y vaca (Mahón), madurados y con Denominación de Origen, para asegurar el origen y la genuidad de las leches utilizadas en su fabricación.

IV.6.1. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA

Se realizaron tres mezclas experimentales (MI, MII y MIII) que contenían 0, 0,250, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 y 25% de sustitución de queso de oveja (Roncal) por queso de cabra fresco (MI), tierno (MII) y madurado (MIII) de la manera descrita en la sección III.2.1.3. de este trabajo. Cada mezcla se analizó en 6 ensayos independientes, con los que se realizó un estudio estadístico utilizando el programa "Statview", representando los valores medios obtenidos en forma de recta patrón. Cada punto de la recta patrón representa por lo tanto, la media de los valores de absorbancia a 405 nm de las seis experiencias independientes realizadas con cada mezcla.

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

En primer lugar, se determinaron las concentraciones idóneas de los reactivos utilizados en los ensayos, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.2.8.1. de esta memoria, encontrándose que eran las mismas para las tres mezclas y resultando que la dilución óptima del Ac_m B2B era la 1/2000 (v/v) en tampón PBST, mientras que la del conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón era la 1/1500 (v/v) en tampón PBST.

Como antígenos se emplearon las 3 mezclas experimentales de quesos que contenían 0, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 y 25% de queso de cabra en mezcla con el de oveja, a la dilución 1/1600 (v/v) en tampón PBS.

La Figura IV.29. muestra los resultados de la sustitución de queso madurado de oveja (Roncal) por queso fresco de cabra (MI). Cada punto representa la media de la absorbancia de seis experiencias distintas. La ecuación resultante para la detección y cuantificación de queso fresco de cabra en queso madurado de oveja, fue de: $\log A_{405} = -0,4533 + 0,5003 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,992$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,990$ ($p=0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de oveja por queso fresco de cabra.

A continuación, se analizó la mezcla queso madurado de oveja (Roncal) con queso tierno de cabra (Garrotxa) en (MII). Los resultados obtenidos con esta mezcla se muestran en la Figura IV.30., cuya ecuación para el rango de sustitución del 0,25 al 25% fue de: $\log A_{405} = -0,4639 + 0,5763 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,991$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,989$ ($p=0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de oveja por queso tierno de cabra.

Los resultados obtenidos al analizar la tercera mezcla experimental (MIII), utilizando como queso de cabra el madurado (Cáceres), se muestran en la Figura IV.31. En este caso, la ecuación resultante para el rango de sustitución del 0,25 al 25% de queso madurado de oveja por queso madurado de cabra fue: $\log A_{405} = -0,4486 + 0,50867 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,945$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,936$ ($p=0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de oveja por queso madurado de cabra.

Finalmente, en la Figura IV.32. se muestra la absorbancia a 405 nm de las muestras con los porcentajes de sustitución del 0,25 al 25% del queso madurado de oveja (Roncal) por el queso fresco, tierno (Garrotxa) y madurado (Cáceres) de cabra. De ella se deduce,

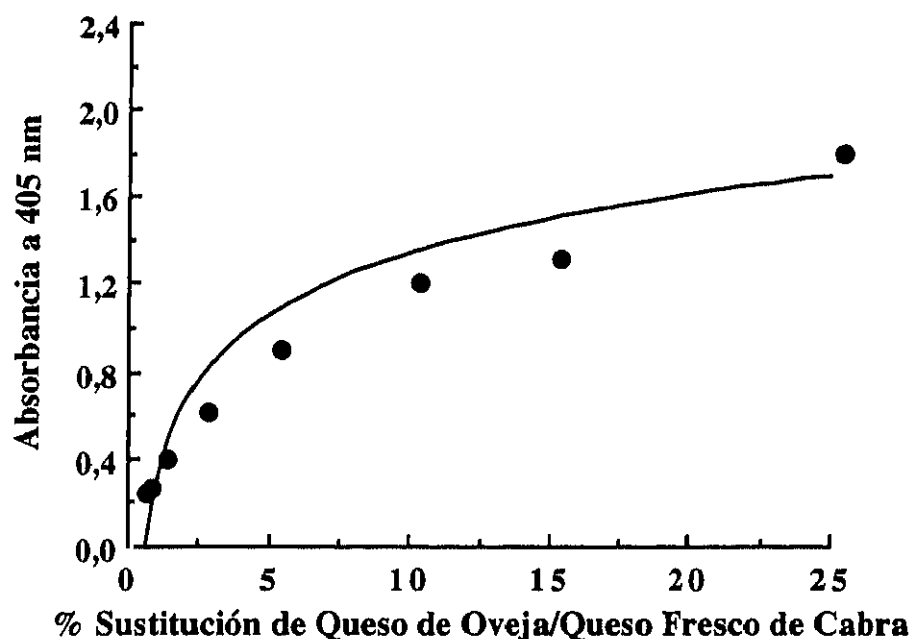


Figura IV.29. Detección de queso fresco de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

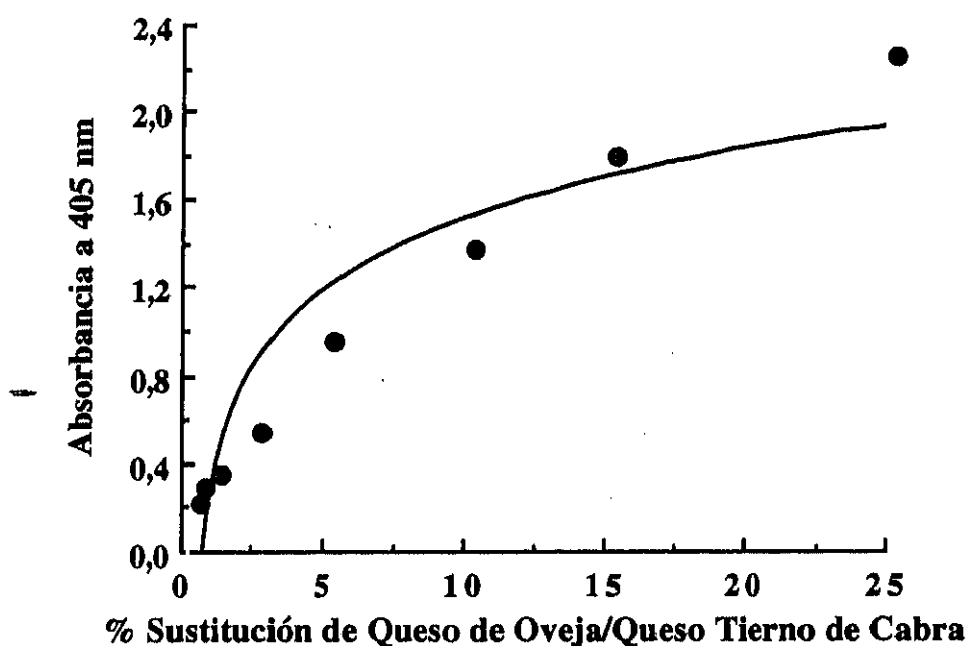


Figura IV.30. Detección de queso tierno de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

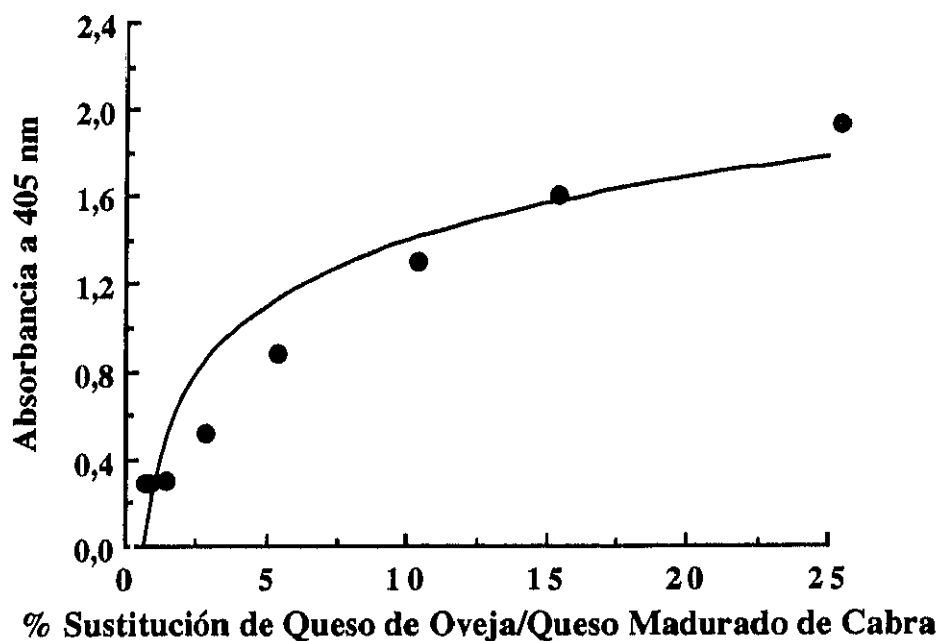


Figura IV.31. Detección de queso madurado de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

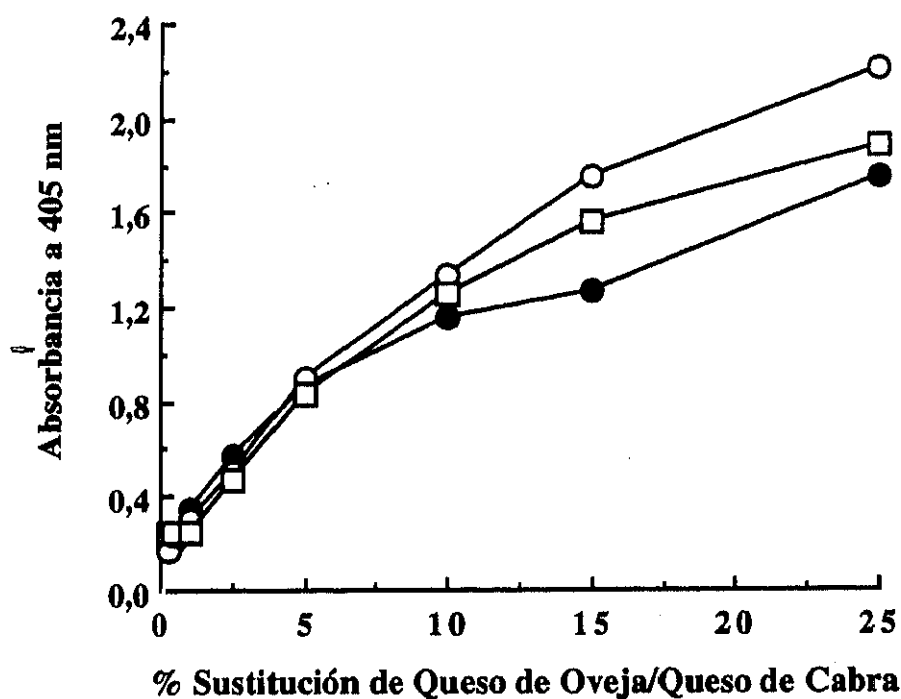


Figura IV.32. Detección de queso fresco (○), tierno (●) y madurado (□) de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

que utilizando la técnica del ELISA Indirecto descrito es posible detectar y cuantificar la presencia de leche de cabra en queso madurado de oveja, observándose diferencias en la absorbancia a 405 nm según el período de maduración del queso de cabra utilizado. Sin embargo, al igual que el caso de las mezclas lácteas, las diferencias son menores en los porcentajes de sustitución menores (0,25-5%).

B. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

Para la detección y cuantificación de queso de cabra en queso de oveja, se ha desarrollado y puesto a punto, además del ELISA Indirecto previamente descrito, una técnica de ELISA Competitivo.

Después de varios ensayos preliminares, se establecieron las condiciones óptimas de trabajo; que fueron las mismas para las tres mezclas:

- Antígeno: como antígeno se utilizaron 20 µg/pocillo de las caseínas totales de cabra liofilizadas (extracto antigénico CC).

- Muestras problema: los diferentes porcentajes de sustitución de queso de oveja por queso de cabra, de las tres mezclas experimentales realizadas (MI, II,III), a la dilución 1/50 (v/v) en tampón PBST.

- Anticuerpo: el monoclonal B2B, parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico, a la dilución 1/1000 (v/v) en tampón PBST.

- Conjugado: el comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas de conejo y conjugadas al enzima peroxidasa de rábano, diluido a la 1/1500 (v/v) en tampón PBST.

Los resultados obtenidos utilizando la técnica del ELISA Competitivo se muestran en función del porcentaje de Inhibición, calculado de la manera descrita en la sección IV.5.1.C. Los resultados obtenidos se analizaron de la manera descrita en el ELISA Indirecto, por lo que cada punto de la gráfica representa la media del porcentaje de inhibición de seis experiencias distintas realizadas con cada una de las tres mezclas experimentales.

La Figura IV.33. muestra que, con los resultados obtenidos utilizando esta técnica, es posible detectar y cuantificar la sustitución de un 0,25 a un 25% de sustitución de queso madurado de oveja (Roncal) por queso fresco de cabra (MI), mediante la ecuación: \log

$A_{405} = 0,1203 - 0,3855 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,983$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,980$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso madurado de oveja por queso fresco de cabra.

Siguiendo la misma metodología, para porcentajes de sustitución del 0,25 al 25% de queso madurado de oveja (Roncal) por queso tierno de cabra (Garrotxa) (MII) (Figura IV.34.), se obtuvo la ecuación: $\log A_{405} = 0,1321 - 0,3539 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,981$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,978$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso madurado de oveja por queso tierno de cabra.

Asimismo, para la detección y cuantificación de porcentajes de sustitución en el rango del 0,25 al 25% de queso madurado de oveja (Roncal) por queso madurado de cabra (Cáceres) (MIII) (Figura IV.35.), la ecuación obtenida fue: $\log A_{405} = 0,1787 - 0,3344 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,962$ y el coeficiente de regresión ajustado Adj. $r^2 = 0,956$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso madurado de oveja por queso madurado de cabra.

En la Figura IV.36. se observan los porcentajes de inhibición obtenidos con las tres mezclas para los distintos porcentajes de sustitución. De los resultados obtenidos, utilizando la técnica del ELISA Competitivo, es posible afirmar que dicha técnica es válida en la detección y cuantificación de la sustitución de queso de oveja por queso de cabra en el rango de 0,25 al 25%, mejorando los resultados obtenidos con el ELISA Indirecto y que las variaciones resultantes del período de maduración del queso de cabra empleado, son mínimas.

IV.6.2. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE VACA

Como en el caso de los quesos de oveja, se utilizaron 3 mezclas experimentales de queso madurado de vaca (Mahón) con los quesos de cabra fresco (MIV), tierno (Garrotxa) (MV) y madurado (Cáceres) (MVI), de la manera descrita en la sección III.2.1.3. De cada mezcla se realizaron 6 ensayos independientes realizando el estudio estadístico de los resultados experimentales de la manera descrita en el apartado IV.6.1.

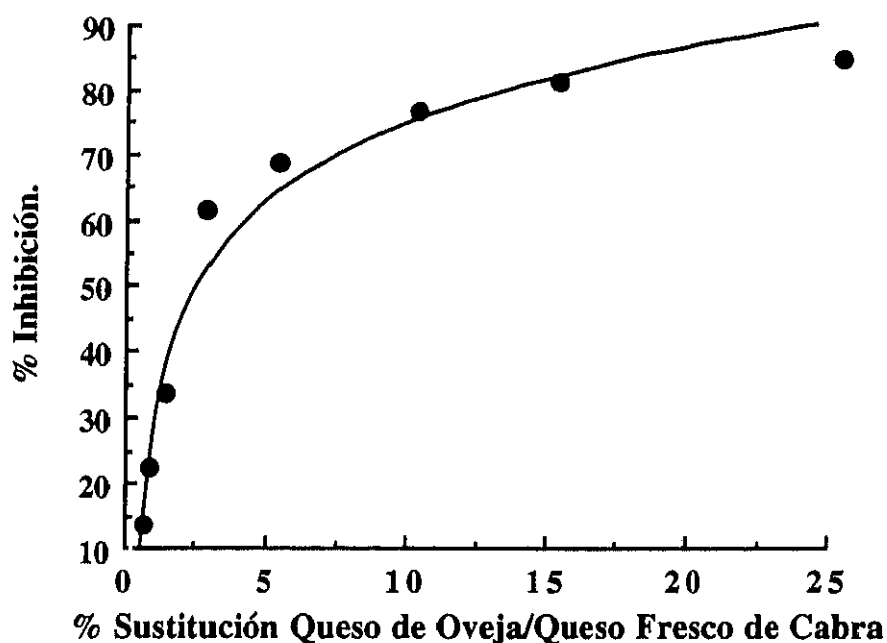


Figura IV.33. Detección de queso fresco de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

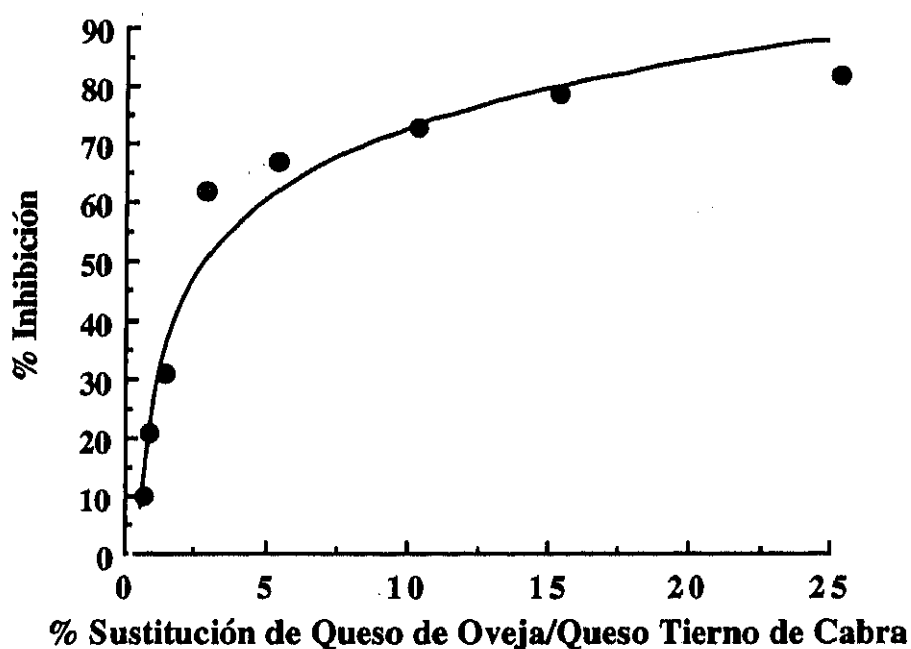


Figura IV.34. Detección de queso tierno de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

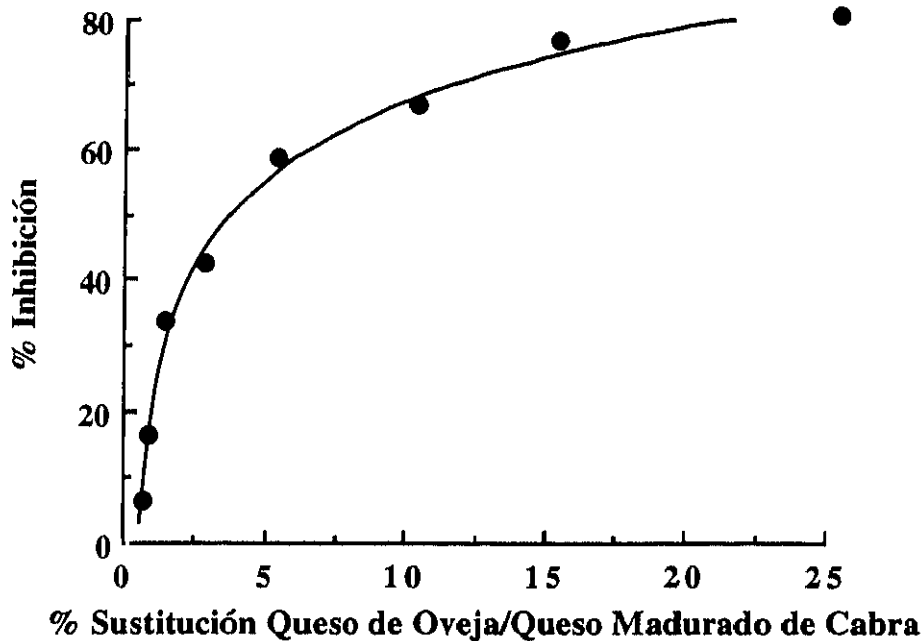


Figura IV.35. Detección de queso madurado de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

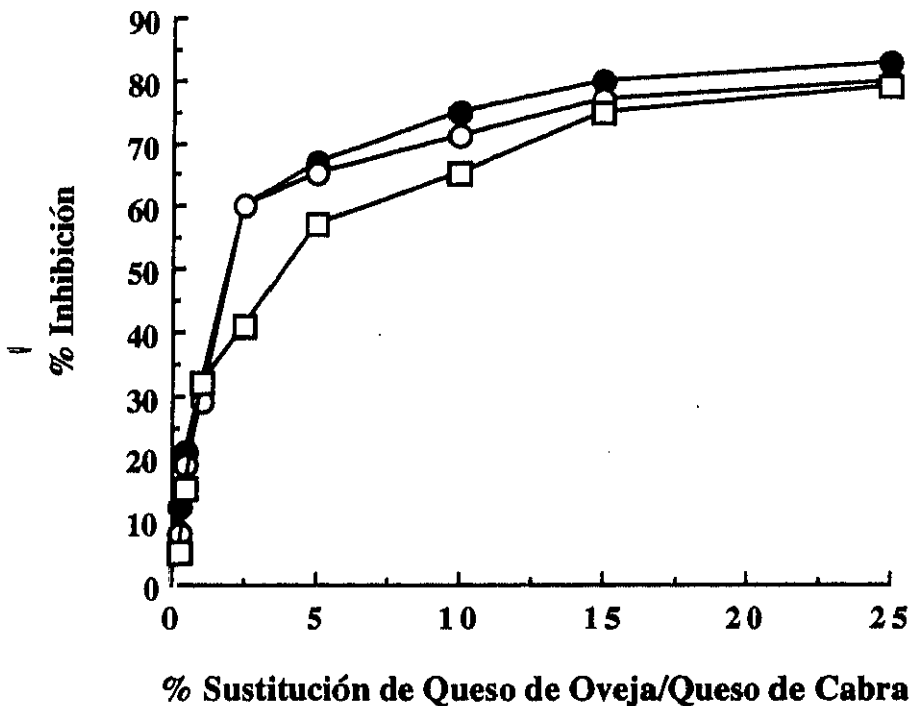


Figura IV.36. Detección de queso fresco (○), tierno (●) y madurado (□) de cabra en queso madurado de oveja, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

A. TECNICA DEL ELISA INDIRECTO

El inmunosuero y el conjugado fueron los mismos que los descritos en el apartado IV.6.1.A. La dilución más idónea de los antígenos utilizados (los diferentes porcentajes de sustitución de queso de vaca por queso de cabra fresco, tierno y madurado en queso de vaca) fue la 1/800.

En las figuras IV.37., IV.38. y IV.39. se muestran los valores de absorbancia obtenidos para los porcentajes de sustitución del 0,25 al 25% de vaca madurado por los quesos de cabra fresco, tierno y madurado. Con la metodología empleada, el ELISA Indirecto es válido para la detección y cuantificación de porcentajes de sustitución del 0,5 al 25% de queso devaca por queso de cabra. Las ecuaciones resultantes en cada caso fueron:

(a).- Mezcla de queso madurado de vaca (Mahón)/queso fresco de cabra (MIV): $\log A_{405} = -0,4312 + 0,574 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,993$, un Adj. $r^2 = 0,992$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso fresco de cabra.

(b).- Mezcla de queso madurado de vaca (Mahón)/queso tierno de cabra (Garrotxa) (MV): $\log A_{405} = -0,4591 + 0,5728 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,989$, un Adj. $r^2 = 0,987$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso tierno de cabra.

(c).- Mezcla de queso madurado de vaca (Mahón)/queso madurado de cabra (Cáceres)(MVI): $\log A_{405} = -0,5007 + 0,5639 \log x$, con un coeficiente de regresión de $r^2 = 0,964$, un Adj. $r^2 = 0,958$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso madurado de cabra.

En la Figura IV.40. se muestran los valores de absorbancia obtenidos con las tres mezclas, observando que los valores procedentes de la MVI (queso madurado de cabra en queso madurado de vaca,) son menores que los de las otras dos mezclas.

B. TECNICA DEL ELISA COMPETITIVO

En esta técnica, se utilizaron el antígeno, el inmunosuero y el conjugado a las mismas diluciones que las descritas en la sección IV.6.2.B. Las muestras problema fueron los diferentes porcentajes de sustitución (del 0,25 al 25%) de las 3 mezclas experimentales realizadas (queso madurado de vaca (Mahón)/(queso fresco, tierno (Garrotxa) y madurado

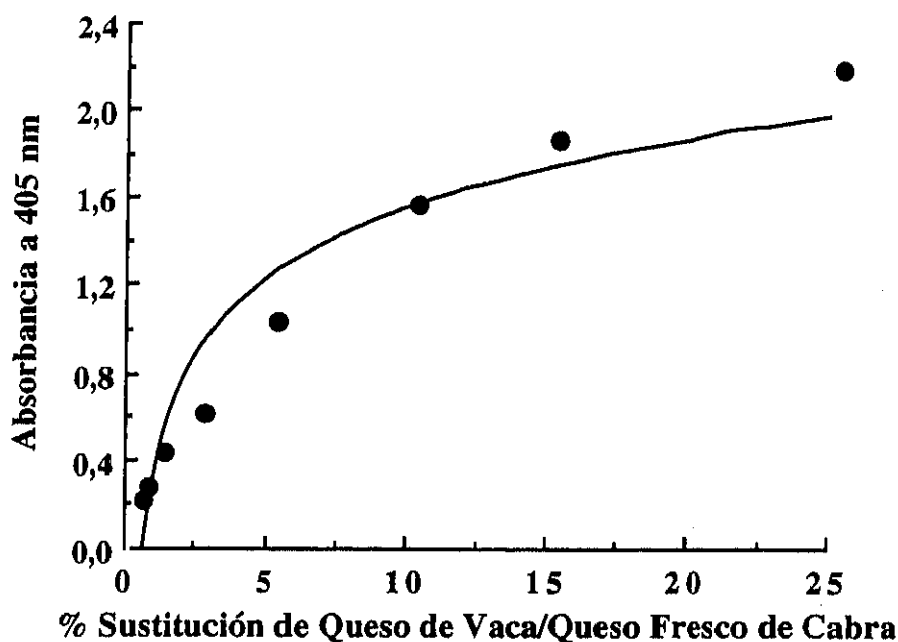


Figura IV.37. Detección de queso fresco de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes

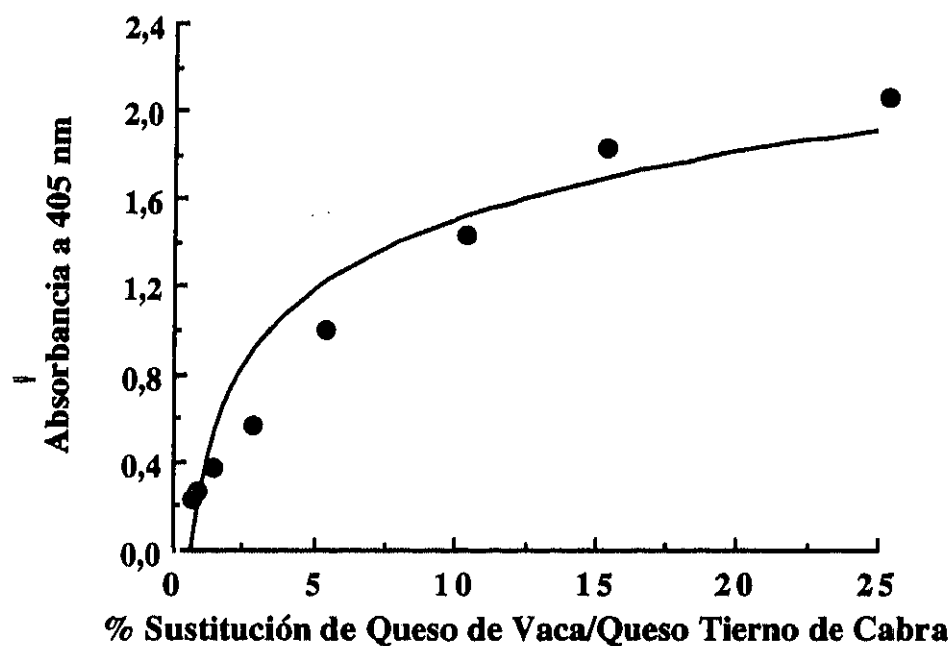


Figura IV.38. Detección de queso tierno de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

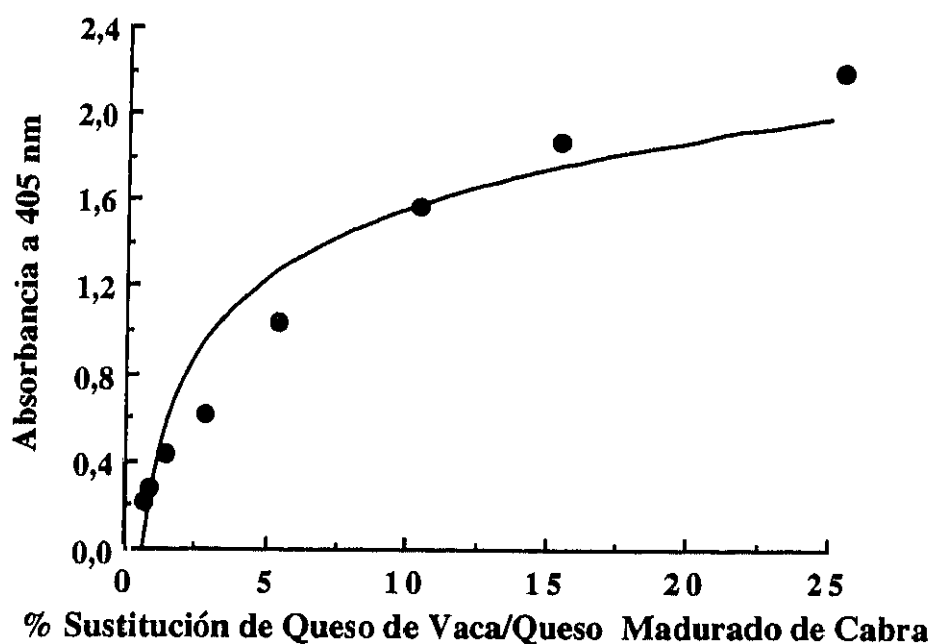


Figura IV.39. Detección de queso madurado de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

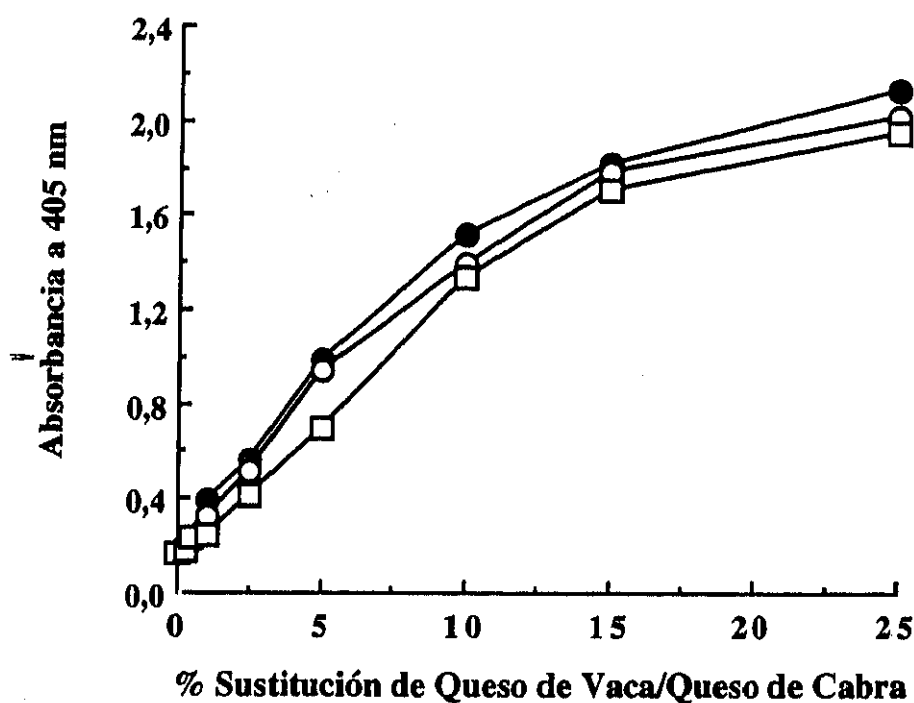


Figura IV.40. Detección de queso fresco (○), tierno (●) y madurado (□) de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Indirecto. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

(Cáceres) de cabra), a la dilución 1/50.

En la Figura IV.41. se muestran los resultados obtenidos para porcentajes de sustitución del 0,25 a 25% para la mezcla queso madurado de vaca/queso fresco de cabra (MIV), con la siguiente ecuación: $\log A_{405} = 0,1247 - 0,4724 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,943$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,933$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso fresco de cabra.

En el caso de la mezcla queso madurado de vaca (Mahón)/queso tierno de cabra (Garrotxa) (MV) los resultados se observan en la Figura IV.42., y la ecuación obtenida fue: $\log A_{405} = 0,1868 - 0,3651 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,979$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,976$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso tierno de cabra.

Asimismo, la relación obtenida entre el porcentaje de Inhibición y los porcentajes de sustitución en el rango 0,25 al 25%, de queso madurado de vaca (Mahón)/queso madurado de cabra (Cáceres) (MVI) se muestran en la Figura IV.43. y la ecuación obtenida fue: $\log A_{405} = 0,2156 - 0,7330 \log x$, cuyo coeficiente de regresión fue de $r^2 = 0,941$ y el coeficiente de regresión ajustado $\text{Adj. } r^2 = 0,931$ ($p = 0,0001$), siendo x el porcentaje de sustitución de queso de vaca por queso de cabra.

Finalmente, en la Figura IV.44. se muestran los valores de absorbancia obtenidos con las tres mezclas de queso de vaca/queso de cabra. De los resultados obtenidos se deduce que, la técnica del ELISA Competitivo mejora la detección y cuantificación del queso de cabra en queso de vaca para valores de sustitución bajos y, además, mientras los valores obtenidos para las mezclas con queso tierno y madurado son prácticamente iguales, los obtenidos para la mezcla con queso fresco son más elevados.

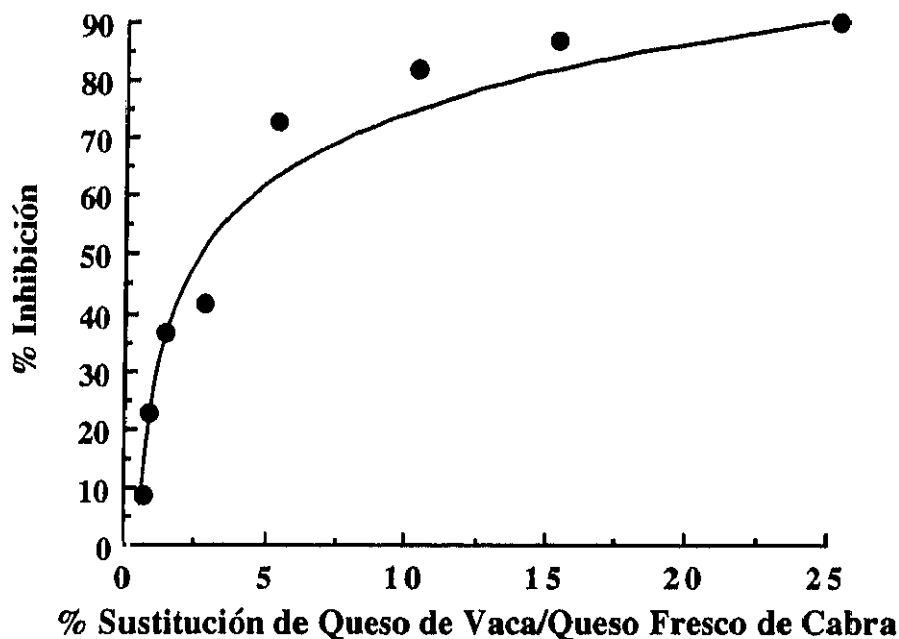


Figura IV.41. Detección de queso fresco de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

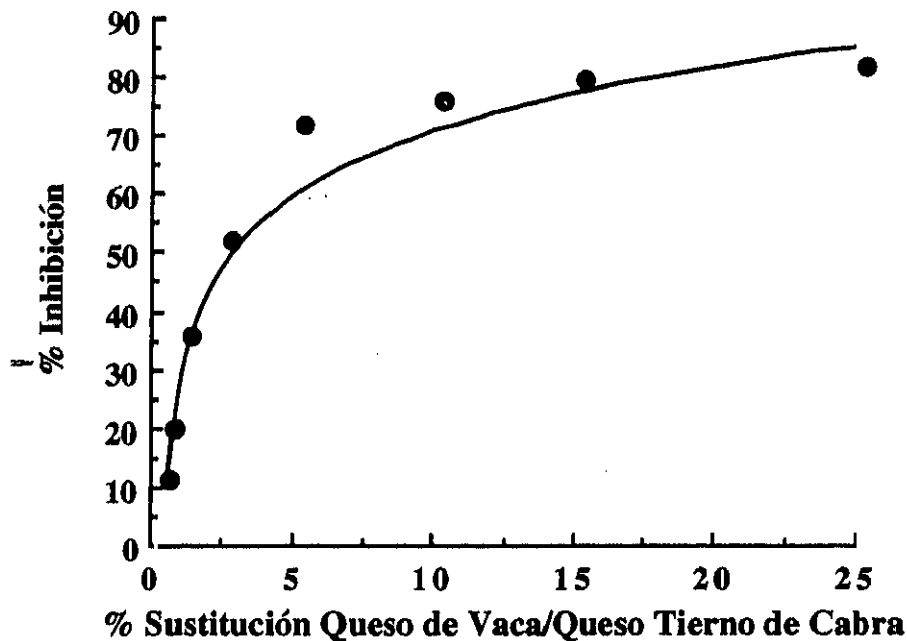


Figura IV.42. Detección de queso tierno de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

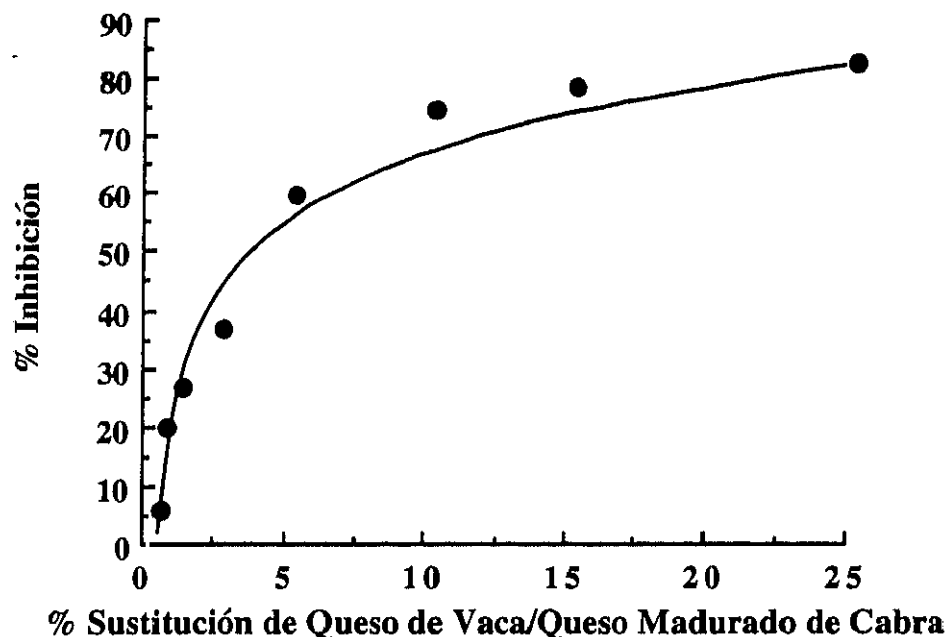


Figura IV.43. Detección de queso madurado de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

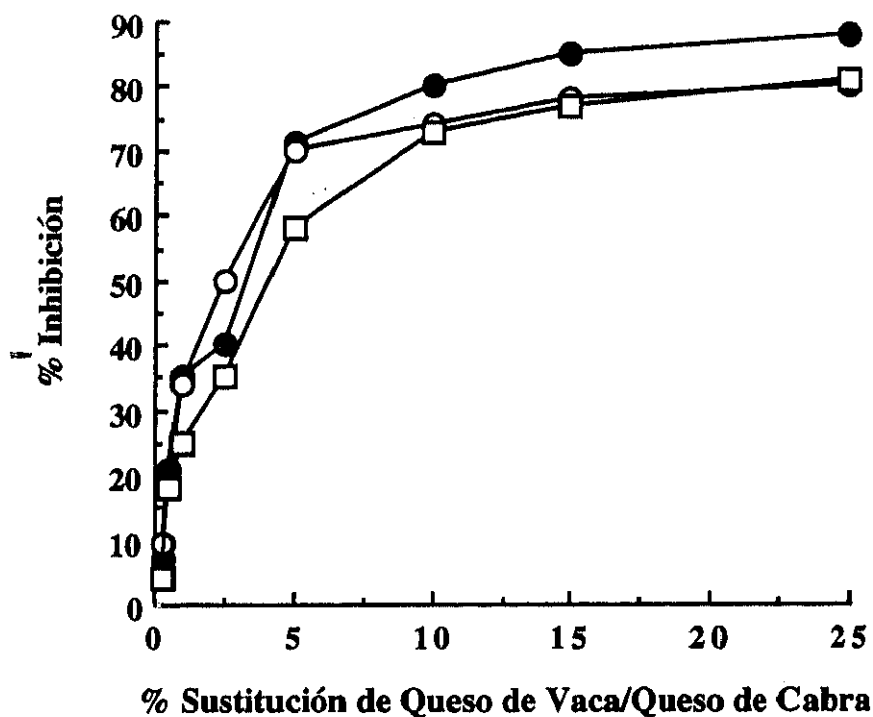


Figura IV.44. Detección de queso fresco (○), tierno (●) y madurado (□) de cabra en queso madurado de vaca, utilizando la técnica del ELISA Competitivo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de los resultados de 6 experiencias diferentes.

CAPITULO V

DISCUSION

V.1. OBTENCION, FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS CASEINAS DE LA LECHE DE CABRA

Como se ha señalado en la exposición del problema a investigar, el objetivo de este trabajo consistía en la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la fracción caseínica más inmunoreactiva de la leche de cabra, para su posterior utilización en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), que permitan la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas frescas y en quesos madurados.

La especificidad de un inmunoensayo viene en gran parte determinada por el inmunógeno utilizado en la producción de los anticuerpos. En la selección de un antígeno deben considerarse características tales como peso molecular, estructura tridimensional y solubilidad (Rittenburg y Grothaus, 1992). La mayoría de las técnicas inmunológicas descritas para la identificación de leches de diferentes especies animales en mezclas lácteas, emplean anticuerpos policlonales obtenidos de conejos frente a las proteínas del suero de la leche, las caseínas totales, inmunoglobulinas o péptidos sintéticos (Aranda y col., 1988; 1993; Calvo y col., 1989; Rodríguez y col., 1991; 1994; García y col., 1993; 1994; Rolland y col., 1993; 1995).

Algunos investigadores han evaluado la antigenicidad de las proteínas de la leche de vaca con el objeto de eliminar los problemas alérgicos derivados de su utilización en preparados alimenticios para niños. May y col. (1982), determinaron que las proteínas del suero de la leche de vaca eran más antigénicas que las caseínas, aunque cuando la leche se somete a tratamientos térmicos, las proteínas del suero se desnaturalizan y disminuye su antigenicidad (Kishlaw y col., 1982; Heppell y col., 1984; Heppell, 1985). Asimismo, Mahmoud y col. (1992), han estudiado el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la antigenicidad de las caseínas, con el fin de utilizarla en preparados alimenticios para niños, determinando que cuando se ha realizado el 10% de la hidrólisis enzimática se produce una disminución muy fuerte de la antigenicidad de las caseínas, que no se reduce significativamente durante el resto de la hidrólisis.

Los métodos inmunológicos que utilizan anticuerpos policlonales frente a las proteínas del suero lácteo, presentan el inconveniente de que esta fracción es más sensible al calor que las caseínas (Calvo y col., 1989; Law y col., 1992), pudiendo originar falsos negativos cuando en las mezclas de leche o quesos se utilizan leches tratadas térmicamente (Samarajeewa y col., 1991). Además, aunque las proteínas del suero de la leche sufren pocas modificaciones durante la proteólisis del queso (Amigo y col., 1991) no son

componentes esenciales de éste, encontrándose sólo en pequeñas proporciones dependiendo del tipo proceso empleado en la fabricación del queso (Núñez y col., 1989; Ramos y Juárez, 1984)

Aunque la antigenicidad de las caseínas es pobre, produciendo títulos bajos de anticuerpos en los animales de experimentación (Levieux, 1977; Radford y col., 1981; Aranda y col., 1988; García y col., 1989; Gazzaz y col., 1992), los inmunoensayos que utilizan anticuerpos frente a la caseína total de la leche ofrecen ventajas, debido a que su inmunoreactividad no resulta afectada por los tratamientos térmicos de la leche y sólo disminuye ligeramente, durante la maduración del queso (Ramos y Juárez, 1984; Rolland y col., 1993; Pérez y col., 1992). De esta manera, dichos anticuerpos se han utilizado con éxito para la detección de adulteraciones en mezclas de leche fresca, pasteurizada y esterilizada, así como en quesos (Aranda y col., 1988; Rodríguez y col., 1990).

Aunque los inmunoseros obtenidos frente a la caseína total de la leche, son eficaces en la detección y cuantificación de adulteraciones en mezclas lácteas frescas y quesos madurados, en este trabajo se propuso utilizar fracciones purificadas de la caseína de la leche de cabra en la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales. Aunque la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales no requiere la utilización de antígenos altamente purificados, la utilización de proteínas purificadas debería producir un mayor rendimiento en la obtención de los anticuerpos monoclonales de interés; además, debido a que la comparación de las estructuras primarias de las caseínas de las especies bovina, caprina y ovina revela una gran similitud, especialmente entre las caseínas ovinas y caprinas (Jaubert y Martin, 1992), consideramos muy importante la obtención de extractos antigénicos purificados para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de la leche de cabra. Por tanto, como paso previo de los demás, se procedió al fraccionamiento, aislamiento y purificación de las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ de la leche de cabra, ya que éstas no se encuentran disponibles comercialmente.

En la sección II.3.3. de esta memoria, se resumen las técnicas analíticas utilizadas tradicionalmente para el aislamiento, identificación y cuantificación de las caseínas. También se indica que, de todas ellas, la cromatografía de intercambio iónico es la más adecuada al permitir la separación de moléculas que presentando tamaños similares, difieren ligeramente en cuanto a su punto isoeléctrico proporcionando, además, la obtención de fracciones caseínicas homogéneas.

En el fraccionamiento y purificación de las caseínas de la leche, se han utilizado tanto

la cromatografía de intercambio iónico clásica en columna (Thompson, 1966; Mercier y col., 1968; Richardson y Creamer, 1974; 1976; Rose y col., 1969; El-Negoumy, 1976; Davies y Law, 1977; Wey y Withney, 1985; Cayot y col., 1992), como las técnicas cromatográficas de alta resolución: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (Humphrey y Newsome, 1984; Barrefords y col., 1985; Andrews y col., 1985; Haasnot y col., 1986; Davies y Law, 1987; Guillou y col., 1987; St- Martín y Paquin, 1990; Collin y col., 1991; Hollard y col., 1991; Leaver y Law, 1992; Syväoja, 1992; Kaminarides y Anifantakis, 1993). La mayoría de los trabajos se han realizado con leche de la especie bovina, siendo más escasas las referencias acerca del fraccionamiento de las caseínas de la leche de oveja (Mercier y col., 1968; Addeo y col., 1992; Law y col., 1992) y cabra (Richardson y col., 1973; Addeo y col., 1978; Mikkelsen y col., 1987; Dall' Olio y col., 1988; Jaubert y Martín, 1992; Law y Tziboula, 1992).

Richardson y col. (1973) y Dall'Olio y col. (1988), determinaron que el fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra es más problemático que el de las otras especies. Utilizando la técnica de HPLC en fase reversa con una columna Lichrosob RP-8 y un sistema de tampones volátil, Mikkelsen y col. (1987) consiguieron la separación completa de las caseínas de la leche de cabra en cuatro fracciones diferentes (α_{S1} , α_{S2} , β y κ). La utilización de tampones volátiles, tiene la ventaja de que es fácil aislar los componentes puros, libres de sales, simplemente por liofilización de las fracciones individuales.

Dado el carácter anfótero de las caseínas de la leche, estas pueden separarse por FPLC en columnas Mono S (intercambiador catiónico) a pH 3,8 o en columnas Mono Q (intercambiador aniónico) a pH 5-11. Sin embargo, parece ser que el intervalo de pH cercano a la neutralidad (7-8) es el más eficaz en la separación de las caseínas (Andrews y col., 1985). En este trabajo, el fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra, se realizó esencialmente según la técnica descrita por Davies y Law (1987) para el fraccionamiento de las caseínas de la leche de vaca mediante FPLC en una columna Mono Q HR 5/5. Para ello la caseína total de cabra se disolvió en un tampón 5 mM bis-tris-propano conteniendo 3,3 M urea como agente disociante y 14 mM 2-mercaptoetanol como agente reductor de los grupos -S-S-. La separación se realizó a un flujo de 1ml/min y con un gradiente discontinuo de ClNa de 0 a 0,4 M. Como se observa en la Figura IV.1., la caseína caprina eluyó en tres fracciones mayoritarias que, seguidamente, se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en un equipo automatizado Phast-System. Los resultados de la electroforesis (Figura IV.2.),

indicaron que la fracción 1 correspondía a la caseína κ , la fracción 2 a la caseína β y la fracción 3 a la caseína α_s (α_{s1} y α_{s2}), corroborando el perfil de elución obtenido por Davies y Law (1987) en el fraccionamiento de las caseínas bovinas. Este método permite una buena resolución de las caseínas κ y β caprinas, pero los resultados obtenidos con la fracción caseínica α_s sugieren que el fraccionamiento fue incompleto, ya que las caseínas α_{s1} y α_{s2} eluyen de la columna Mono Q a la misma concentración salina, coexistiendo ambas en la misma fracción cromatográfica.

Con el objeto de obtener una mejor resolución de las caseínas caprinas α_{s1} y α_{s2} , procedimos al fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra por cromatografía de intercambio aniónico en columna con DEAE-celulosa, basándonos en los resultados positivos previamente obtenidos con esta técnica, para el fraccionamiento de las caseínas bovinas y ovinas (Mercier y col., 1968, López-Fandiño, 1992). Brevemente, 1 g de caseína liofilizada de cabra se disolvió en un tampón 0,02 M imidazol-HCL, con 3,3 M urea y un 0,1 % de 2-mercaptoetanol, eluyendo las fracciones de caseína en un gradiente continuo de NaCl de 0 a 0,3 M y un flujo de 2 ml/min. Las caseínas de la leche de cabra eluyeron en 5 fracciones diferentes (Figura IV.3.), no bien separadas, por lo que se concluyó que este método no ofrecía resultados aceptables.

Los resultados citados previamente coinciden con los de Jaubert y Martin (1992), los cuales sugieren que la cromatografía de intercambio aniónico empleando las condiciones utilizadas para el fraccionamiento de las caseínas bovinas, no permite la separación de las cuatro caseínas caprinas, mientras que la cromatografía de intercambio catiónico, produce unos resultados satisfactorios. Es por ello, que la caseína de la leche de cabra se fraccionó por cromatografía de intercambio catiónico en una columna con una matriz de S-Sepharose Fast-Flow, que es un intercambiador catiónico fuerte. Para ello 1 gramo de caseína liofilizada de cabra se disolvió en un tampón 25 mM formato sódico conteniendo 0,8 mM ditiotreitól como agente reductor y 7,5 M urea como agente disociativo a un pH 4,0, que tras su elución en un gradiente continuo de 0 a 0,3 M de NaCl, originó la separación de la caseína en 4 fracciones distintas (Figura IV.4.) que una vez dializadas y liofilizadas se caracterizaron por electroforesis SDS-PAGE en un equipo automatizado PhastSystem (Figura IV.5.). El orden de elución de las cuatro caseínas mayoritarias fue: fracción 1, caseína β ; fracción 2, caseína κ ; fracción 3, material proteínico difuso en cantidades vestigiales; fracción 4, caseína α_{s1} con residuos de las caseínas β y κ y fracción 5, mayoritariamente caseína α_{s2} . De la caracterización electroforética de las fracciones caseínicas, se deduce que las fracciones κ y β se encuentran bien purificadas, mientras que en la fracción 4 se encuentra mayoritariamente a la caseína α_{s1} y en la fracción 5, la caseína

α_{S2} .

Como método de purificación de caseínas, la cromatografía de intercambio catiónico presenta un gran número de ventajas respecto a otros métodos alternativos. La capacidad de la resina es alta, así como el flujo, permitiendo fraccionar grandes cantidades de caseínas rápidamente. Además, las caseínas individuales eluyeron en picos razonablemente separados minimizando así las contaminaciones de los componentes individuales en las fracciones resultantes. Este método podría utilizarse analíticamente, utilizando una columna Mono S HR 5/5 equivalente a la S-Sepharose Fast-Flow, pero según Jaubert y Martin (1992) presentaría limitaciones: trabajar a pH 4,0 cercano al punto isoeléctrico de las caseínas caprinas requiere el uso de tampones con una molaridad elevada del agente disociante (al menos 7,5 mol/l urea), lo cual generaría una alta presión en la columna debido al incremento de viscosidad del tampón; por otra parte, los resultados obtenidos con la cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q HR 5/5, no son muy reproducibles (Collin y col., 1991).

Law y Tziboula (1992) determinaron la dificultad de separar las caseínas caprinas α_{S1} y α_{S2} a pH alcalino, debido a las diferencias en la carga neta negativa de sus variantes. no obstante, utilizando una columna Mono S HR 5/5 de intercambio catiónico, con un tampón 6 M urea y un pH de 5, consiguieron el fraccionamiento de las caseínas caprinas en 5 fracciones distintas. Según estos autores, la técnica de FPLC con matrices de intercambio catiónico es un método rápido, automatizado, que es aplicable a las caseínas bovinas, caprinas y ovinas y puede utilizarse cuantitativamente para determinar las cantidades relativas de caseínas en relación con las propiedades de la leche.

Recientemente, Kaminarides y Anifantakis (1993) realizaron un estudio comparativo de la separación de las caseínas bovinas, ovinas y caprinas mediante la técnica de HPLC en un intercambiador aniónico fuerte (P.L-SAX 8 μ 1000A). Las caseínas de las leches de cabra y oveja presentaron perfiles cromatográficos similares, pero considerablemente diferentes a los de las caseínas bovinas. Con esta técnica, se consigue la separación de la caseína β caprina en sus dos componentes β_1 y β_2 , pero las caseínas α_S eluyen juntas de la columna. Estos autores sugieren que un gradiente de NaCl más débil en la zona de elución de la caseína α_S permitiría, probablemente, la separación de esta fracción en sus dos componentes (α_{S1} y α_{S2}). Por otra parte, el estudio comparativo permitió determinar que la caseína α_{S1} bovina elufa de la columna más tarde que sus homólogas ovina y caprina bajo las mismas condiciones cromatográficas, por lo que este método podría utilizarse para

determinar la adición de leche de vaca a las de oveja y cabra.

De los resultados obtenidos en nuestro trabajo, podemos concluir que la cromatografía de intercambio catiónico permite la separación satisfactoria de las caseínas caprinas, bien utilizando la cromatografía clásica en columna o las modernas técnicas de FPLC. Las técnicas FPLC tienen la ventaja de ser rápidas, seguras y fáciles de realizar, pero presentan el inconveniente de la obtención de pequeñas cantidades de proteína.

V.2. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA PARCIAL DE LAS FRACCIONES CASEINICAS PURIFICADAS

Una vez obtenidas las diferentes fracciones caseínicas de la leche de cabra, el siguiente paso consistió en caracterizarlas inmunológicamente, con el objeto de determinar cual de ellas era la más inmunoreactiva y utilizarla como inmunógeno para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales en los animales de experimentación.

El grupo investigador de Otani y col. (1986) ha realizado numerosos estudios para determinar la estructura antigénica y localización de los determinantes antigénicos de las caseínas de la leche de vaca. La técnica se basa en la hidrólisis de las caseínas en fragmentos peptídicos de tamaño variable que, posteriormente se enfrentan mediante técnicas de inmunodifusión y ELISA a anticuerpos policlonales obtenidos de conejos frente a las caseínas α_s , β y κ . La caseína α_s tendría 6 determinantes antigénicos, asociados al menos uno de ellos con cada una de las regiones peptídicas 1-54, 124-135 y 136-196 y, dos de ellos, en la región 61-123. La caseína β tendría también 6 determinantes antigénicos en su molécula, asociados al menos uno de ellos con cada una de las regiones peptídicas 1-25, 26-60, 61-93, 94-102, 103-109, 110-140 y 157-185 (Otani y col., 1988), mientras que la caseína κ tendría 5 determinantes antigénicos, tres de ellos asociados a las regiones peptídicas 1-95 y 107-169 y, al menos uno a la región 96-106 (Otani y col., 1991). Estos autores determinaron también que el tamaño molecular mínimo de las caseínas de la leche de vaca para originar problemas derivados de su inmunogenicidad, estaría comprendido entre 3.000 y 5.000 daltons y que un pequeño número de aminoácidos son críticos para su unión con los anticuerpos (Otani y col., 1990; Kobayashi y col., 1991). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio similar en el caso de las caseínas de la leche de cabra.

En nuestro trabajo, las caseínas de la leche de cabra purificadas por cromatografía

líquida rápida de proteínas (FPLC) en una columna Mono Q HR 5/5 (α_s , β y κ) y por cromatografía de intercambio catiónico en una columna con una matriz de S-Sepharose Fast-Flow (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), se enfrentaron mediante la técnica del ELISA Indirecto a anticuerpos policlonales obtenidos de conejo (anti-CC) y específicos de la leche de cabra (Rodríguez y col., 1991). De los resultados obtenidos (Figuras IV. 6. y IV. 7.), se deduce que la fracción que contiene la caseína α_{s2} purificada por cromatografía de intercambio catiónico en una columna con una matriz de S-Sepharose Fast-Flow, es la más inmunoreactiva, probablemente porque es la fracción con el mayor número de epítomos específicos de las caseínas de la leche de cabra.

V.3. OBTENCION DE INMUNOSUEROS FRENTE A LA CASEINA α_{s2} DE LA LECHE DE CABRA

Como ya se ha comentado previamente, para el desarrollo de un inmunoensayo pueden utilizarse dos tipos de anticuerpos: policlonales y monoclonales. Ambos se han empleado con éxito en el desarrollo de técnicas inmunológicas, aunque los anticuerpos monoclonales proveen de un grado extra de especificidad que puede ser necesario en algunos casos. La sensibilidad y especificidad requeridas, el tipo de inmunoensayo a utilizar y el volumen de suero necesario, son algunos de los factores que influyen en la obtención de uno u otro tipo de anticuerpos (Rittenburg y Grothaus, 1992).

V.3.1. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES

En la obtención de anticuerpos policlonales se pueden utilizar diversos animales, siendo las especies más comunes el conejo, el cobaya, la rata, el ratón (Harlow y Lane, 1988). La utilización de animales grandes como cerdos, carneros, machos cabríos y caballos, permiten la obtención de elevadas cantidades de suero y son los animales de elección en la producción comercial de anticuerpos (Rittenburg, 1990; Rittenburg y Grothaus, 1992). Es importante conocer que la inmunogenicidad de un antígeno aumenta al hacerlo la distancia filogenética entre la especie que lo posee y la receptora. Por razones prácticas, los conejos son los animales más empleados en la obtención de anticuerpos policlonales debido a su fácil manejo y mantenimiento, generan un volumen aceptable de suero (500 ml) y responden a una gran cantidad de antígenos (Harlow y Lane, 1988).

El método y el protocolo de inmunización influyen el tipo de anticuerpo producido y la intensidad de la respuesta. El número y la frecuencia de las inmunizaciones, la cantidad de antígeno inyectado, la ruta de inmunización y el tipo de adyuvante empleado, son factores a considerar en la inmunización de los animales (Rittenburg, 1990). Los adyuvantes son preparaciones que aumentan la inmunogenicidad de un antígeno y se utilizan tanto en la producción de anticuerpos policlonales como monoclonales. El adyuvante de Freund's es el de elección cuando se dispone de poco inmunógeno, si se tienen grandes cantidades o el compuesto es muy inmunogénico, se deben utilizar otros, debido a que éste puede originar reacciones de hipersensibilidad (Harlow y Lane, 1988; Hefle, 1995).

En nuestro trabajo, los conejos se inmunizaron con la fracción que contenía la caseína α_{s2} de la leche de cabra, purificada por cromatografía de intercambio catiónico y el adyuvante de Freund's. Una vez obtenidos los inmunoseros, los anticuerpos se purificaron por precipitación selectiva con sulfato amónico, que es un método sencillo, económico, aplicable a grandes volúmenes de suero y útil para la concentración y purificación de anticuerpos de cualquier especie. Además, la purificación parcial de los inmunoseros por precipitación con sulfato amónico, protege a las inmunoglobulinas frente a su desnaturalización, inhibe el crecimiento microbiano y reduce las interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y otras sustancias cuya superficie posee una configuración molecular similar a la de los epítomos del antígeno.

Los resultados obtenidos al enfrentar el inmunosero anti-caseína α_{s2} de la leche de cabra obtenido de conejos, con los extractos liofilizados de las caseínas de la leche de vaca, oveja y cabra mediante la técnica del ELISA Indirecto (Tabla IV.1.), demostraron que este inmunosero reconoce no sólo las caseínas de la especie frente a la que se obtuvo sino también las de las otras dos especies. Dicha reactividad cruzada se debe a que los anticuerpos policlonales pueden reconocer epítomos en las mismas proteínas de especies cercanas y puede eliminarse por purificación de los inmunoseros (Gazzaz y col., 1992).

En nuestro departamento, se han obtenido anticuerpos policlonales específicos frente a las caseínas de la leche de cabra y vaca (Rodríguez, 1992) y frente a las proteínas del suero de la leche de vaca y cabra (García, 1990), mediante purificación por cromatografía de afinidad. Para ello, los inmunoseros se purificaron en una columna que contenía Sepharosa 4B-CNBr, cuyo ligando de afinidad era el extracto antigénico liofilizado frente al que se habían obtenido y, posteriormente, se neutralizaron con las proteínas antigénicas liofilizadas de la leche de las especies heterólogas, o bien, se purificaron por cromatografía

de afinidad en tres columnas de Sepharosa 4B-CNBr, conteniendo las dos primeras las proteínas lácteas de las especies heterólogas y, la última, las de la leche de la especie frente a la que se obtuvo el inmunosuero. Sin embargo, el proceso de purificación de los inmunosueros para obtener los correspondientes anticuerpos específicos es muy largo y costoso. Además los anticuerpos específicos purificados, constituyen una mezcla de inmunoglobulinas, que varían en su afinidad por los distintos determinantes antigénicos y poseen una respuesta inmunológica distinta dependiendo del lote animal del que procedan.

V.3.2. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

El suero de un animal inmunizado contiene muchas clases diferentes de anticuerpos y la composición del inmunosuero varía dependiendo del tiempo de inmunización y de la intensidad de la respuesta inmune. Un problema frecuente es la obtención de inmunosueros con propiedades diferentes obtenidos de animales de la misma especie. Por otra parte, para obtener inmunosueros activos, las inmunoglobulinas deben purificarse utilizando técnicas químicas y bioquímicas de purificación largas y costosas (Gazzaz y col., 1992).

La obtención de anticuerpos homogéneos de especificidad definida, fue durante mucho tiempo el objetivo de muchos investigadores, que se alcanzó con el desarrollo de la tecnología de producción de hibridomas. Desde que en 1975 Köhler y Milstein desarrollaron la metodología para la obtención de anticuerpos monoclonales, éstos se han utilizado con éxito en los inmunoensayos. Las características más relevantes de estos anticuerpos son su homogeneidad, su especificidad por un epítipo determinado y la capacidad de obtenerlos en cantidades ilimitadas (Harlow y Lane, 1988). Los anticuerpos monoclonales derivan de una única célula que secreta inmunoglobulinas, procedente de un hibridoma formado por la fusión de un linfocito del bazo de un animal inmunizado con un tipo especial de célula tumoral, generalmente células de mieloma. Los hibridomas adquieren la capacidad de producir anticuerpos específicos del linfocito hiperinmune y debido a que proceden de una única célula de bazo que secreta un sólo tipo de inmunoglobulinas, los anticuerpos monoclonales son químicamente idénticos y manifiestan la misma especificidad. Cuando los hibridomas crecen, secretan al medio de cultivo anticuerpos o se inyectan en la cavidad peritoneal de los ratones para producir líquido ascítico. Las células de hibridoma pueden conservarse durante largos períodos de tiempo en nitrógeno líquido y recuperarlos, más tarde, para producir más cantidad de anticuerpos (Rittenburg y Grothaus, 1992).

Las fusiones pueden realizarse entre células de la misma especie o de especies distintas, pero el número de hibridomas viables incrementa considerablemente si ambas células proceden de la misma especie animal. El ratón es el animal de elección para la

producción de anticuerpos monoclonales debido a su fácil manejo, son baratos de obtener y responder a menores cantidades de antígeno que otros animales de laboratorio. Además, se prefiere la utilización de ratones Balb/c, debido a que la mayoría de las líneas de mieloma de ratón existentes proceden de esta estirpe, y de esta manera los hibridomas Balb/c x Balb/c, se desarrollan en la cavidad peritoneal de ratones de la misma estirpe.

Los mielomas son células tumorales inducibles en ratones mediante la inyección intraperitoneal de aceite mineral. Los primeros mielomas se obtuvieron de ratones Balb/c por Potter (1972). Estas células pueden secretar anticuerpos y, por ello, las líneas utilizadas para las fusiones celulares se han seleccionado para que carezcan de esta función. También ha sido decisiva en la preparación de híbridos, la obtención de líneas de mieloma carentes de alguno de los enzimas necesarios para la síntesis de nucleótidos por la "ruta de salvación" (Littefield, 1964), como la hipoxantina-guanosina- fosforibosiltransferasa (HGPRT) o la timidín-quinasa (TK). Con mielomas HGPRT⁻ o TK⁻, se pueden realizar fusiones y eliminar las células no fusionadas con compuestos que bloquean la "síntesis de novo" del DNA como la aminopterina, el metotrexato, o la azaserina, añadidas al medio de cultivo. La aminopterina y el metotrexato bloquean tanto la síntesis de purinas como de pirimidinas, por lo que deben suplementarse con hipoxantina y timidina. La azaserina solamente bloquea la síntesis de purinas y se suplementa con hipoxantina (Harlow y Lane, 1988).

Utilizando la tecnología de obtención de hibridomas, se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a cada una de las fracciones caseínicas de la leche de vaca (Nagaune y col., 1988; Feng y Cunningham-Rundles, 1989; Kuzmanoff y col., 1990; Kuzmanoff y col., 1991a; 1991b; Leung y col., 1991; Oudshoorn y col., 1994), con el fin de estudiar su regulación hormonal durante la lactogénesis, su estructura y conformación, para evaluar sus interacciones con otras proteínas y para caracterizar diferentes partes de su molécula en relación a su antigenicidad. Recientemente, Levieux y Venien (1994) han obtenido dos anticuerpos monoclonales específicos de la β -lactoglobulina y han desarrollado un ELISA Competitivo para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en leche de oveja. Hasta ahora, sólo se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a componentes de la leche de vaca, para evaluarlos posteriormente en la detección de leche de vaca en leche de oveja. Sin embargo, no se han descrito anticuerpos monoclonales frente a ningún componente de la leche de cabra, constituyendo éste otro de los objetivos de nuestro trabajo.

Por tanto, para la producción de anticuerpos monoclonales frente a la leche de cabra procedimos a la inmunización de ratones hembras Balb/c con 100 μ g de la fracción que

contiene la caseína α_{s2} de la leche de cabra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando el adyuvante de Freund al igual que en de la inmunización de los conejos. Una vez que se desarrolló una buena respuesta inmune (Figura IV.8.), procedimos a la fusión de las células del bazo (linfocitos) del animal mejor inmunizado con células de mieloma en fase de crecimiento exponencial, utilizando como agente fusionante el polietilenglicol (PEG). Se han descrito varias líneas celulares de células de mieloma eficaces en la obtención de hibridomas: NS1-A4/1, FO, P3-X63Ag8, X63Ag8.653, Sp 2/O Ag 14, pero en nuestra experiencia la línea X63 Ag8.653 (Kearney y col., 1979) es la más eficiente con el protocolo de fusión y selección utilizado en nuestro laboratorio. Esta línea se caracteriza porque no secreta ninguna inmunoglobulina al medio de cultivo y es HGPRT⁻.

En teoría, la fusión celular puede ocurrir espontáneamente, pero esto es poco frecuente por lo que se requiere la utilización de agentes que promuevan la fusión celular, tales como el virus Sendai, lisolecitina o PEG. Actualmente, también se utiliza como inductor de la fusión celular la electrofusión, basada en el la aplicación a las células de una corriente eléctrica por las células, durante un breve período de tiempo. Otros procedimientos utilizados en la obtención de anticuerpos monoclonales, son la transformación de las células productoras de inmunoglobulinas con el virus de Epstein-Barr, donde el DNA del virus transforma las células normales aportándoles el crecimiento continuo y la transfección con DNA procedente de oncogenes (Schönherr y Houwink, 1984). Fue, sin embargo, en 1975 cuando Pontecorvo demostró que el PEG, un poderoso agente fusionante de los protoplastos de las plantas superiores, podía utilizarse con éxito en las células de mamíferos. La fusión con PEG es el método de elección en la obtención de hibridomas, permitiendo una alta reproducibilidad y frecuencia de fusión. En condiciones apropiadas, es entre 100 y 300 veces más eficaz que el virus Sendai, incrementando la frecuencia de híbridos viables (Goding, 1986).

En nuestro trabajo, tras mezclar las células en la proporción adecuada (5:1, linfocito:mieloma), añadimos el PEG al sedimento celular dejándolo actuar durante un cierto tiempo y frenando, a continuación, la reacción. Posteriormente, sembramos las células en un medio de cultivo durante un día para añadir a, continuación, el medio de cultivo selectivo HAT que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina-glicina. La aminopterina, un análogo del ácido fólico, bloquea la "síntesis de novo" del DNA impidiendo el crecimiento de las células de mieloma no fusionadas a los linfocitos, mientras que los linfocitos del ratón inmunizado sólo sobrevivirán unos días en el cultivo "in vitro". Cuando el tamaño de los hibridomas observados en los pocillos es de 1-2 mm de diámetro, lo que en nuestro caso sucedió a los 15 días, se valora en el sobrenadante la presencia de los anticuerpos de

interés, seguir el método elegido para la selección de los hibridomas específicos.

Existen una gran variedad de métodos que permiten la selección de los hibridomas productores de anticuerpos específicos, pero como norma general, debe elegirse el mismo método para el que vaya a ser utilizado el anticuerpo monoclonal y, si es posible usar procedimientos que permitan analizar grandes cantidades de muestra. Los métodos más utilizados son el enzima inmunoensayo (ELISA) o el radio inmunoensayo (RIA) si se requiere una alta sensibilidad, la inmunofluorescencia, si se conviene localizar una determinada estructura celular y la inmunoadsorción en papel de nitrocelulosa en la identificación de anticuerpos monoclonales específicos para una proteína con una masa molecular definida dentro de una mezcla compleja. En nuestro caso, utilizamos como método de selección un ELISA Indirecto, enfrentando los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas a las caseínas totales de la leche de cabra, determinando una eficiencia de fusión muy alta, mayor del 50%, mientras (el 25% de los hibridomas observados producían anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra).

Para determinar cuántos de los hibridomas productores de anticuerpos, producían anticuerpos específicos frente a la leche de cabra, enfrentamos los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas a 20 µg de los extractos antigénicos de caseínas de la leche de vaca, oveja y cabra, extractos cárnicos conteniendo proteínas musculares solubles (de cerdo, vaca, caballo y pollo), proteína de soja, gelatina y seroalbúmina bovina, mediante la técnica del ELISA Indirecto. Ocho de las líneas celulares, denominadas A1H, B2B, B12B, C2H, C6C, C7G, F4E y A6F fueron monoespecíficas para la leche de cabra (Tabla IV.2.).

La caracterización isotípica de la clase y subclase de los anticuerpos, determinó que 6 líneas celulares B2B, B12B, C2H, C6C, C7G y A6F eran productoras de IgG1, mientras que dos de ellas A1H y F4E eran productoras de IgM.

Una vez identificados los hibridomas positivos, el siguiente paso consistió en la clonación de estas ocho líneas celulares, ya que el pocillo positivo original suele contener más de un clon o hibridoma. Existen dos métodos de clonaje, en medio semisólido o por dilución límite (Goding, 1986). En nuestro trabajo, Realizamos el segundo de ellos que consiste en sembrar un número pequeño de células por pocillo (10, 5, 2 o 1), evaluando la presencia de anticuerpos mediante el ELISA Indirecto, y seleccionando los pocillos positivos con la menor densidad celular para clonarlos de nuevo a una menor densidad celular. Normalmente, la clonación se repite tres veces hasta obtener el hibridoma a una concentración teórica de 1 o 0,5 células/pocillo. Se considera que un hibridoma está clonado y estabilizado cuando al menos el 95% de los pocillos, son positivos en el ensayo de

selección. Una vez que los hibridomas se clonaron y estabilizaron, se expandieron gradualmente y, tan pronto como fue posible, se congelaron y conservaron en nitrógeno líquido.

La producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales puede realizarse recogiendo el sobrenadante de cultivo de los hibridomas o mediante la inducción de tumores ascíticos en ratones Balb/c. La concentración de anticuerpos específicos en el sobrenadante del medio de cultivo oscila entre 10 y 100 µg/ml. Si se requieren mayores cantidades de anticuerpos, los hibridomas se inoculan en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, previamente inducidos con 0,5 ml de pristane para facilitar su concentración en el líquido ascítico. La concentración de anticuerpos monoclonales específicos en el líquido ascítico puede ser de 1-10 mg/ml, es decir 1000 veces más concentrados que en el cultivo celular (Goding, 1986). Por otra parte, en la mayoría de los inmunoensayos se prefiere la utilización del sobrenadante del cultivo celular, debido a que éste no se encuentra contaminado con niveles elevados de otros anticuerpos y su concentración es suficiente para la realización de la mayoría de los ensayos (Harlow y Lane, 1988). Por ello, cada línea celular se expandió hasta obtener aproximadamente unos 50 ml de sobrenadante del medio de cultivo y dos líneas celulares (B2B y C2H) se eligieron para la producción de líquido ascítico en ratones Balb/c.

Los anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes del medio de cultivo de las ocho líneas celulares descritas y de los dos líquidos ascíticos, se analizaron frente a 20 µg de las caseínas de la leche de cabra mediante un ELISA Indirecto. En la Figura IV.9 se muestran los resultados obtenidos, de los que se deduce que no todos tienen la misma afinidad por las caseínas de la leche de cabra. Los anticuerpos monoclonales que mostraron mayor actividad (sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares B2B, B12B y C2H y del líquido ascítico B2B) se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico y, de nuevo, se determinó su actividad mediante un ELISA Indirecto frente a las caseínas de la leche de cabra (Figura IV.10.). De los resultados obtenidos, se observa que la purificación por sulfato amónico no afectó la actividad de los tres anticuerpos monoclonales, ya que los resultados fueron similares a los obtenidos con los mismos anticuerpos sin purificar.

Como el objetivo principal de este trabajo consistía en la utilización de anticuerpos monoclonales en la detección de leche de cabra en mezclas lácteas, evaluamos los anticuerpos monoclonales seleccionados frente a la leche cruda de cabra (1/200), para determinar su reconocimiento mediante un ELISA Indirecto. Los resultados obtenidos (Figura IV.11.), indicaron que el Ac_m B2B presente tanto en el sobrenadante del medio de

cultivo como en el líquido ascítico, era el que mostraba una mayor reactividad. Asimismo, el Ac_m B2B (sobrenadante del cultivo celular y líquido ascítico) también se enfrentó a la leche cruda y caseínas de las especies vaca, cabra y oveja, mediante un ELISA Indirecto. En la tabla IV.3. se muestran los resultados obtenidos, en los que se observa que la especificidad del sobrenadante del cultivo celular es mayor que la del líquido ascítico, probablemente debido a que entre un 2 y un 10 % de los anticuerpos del líquido ascítico proceden del ratón y no de las células de hibridoma (Harlow y Lane, 1988). Por último, se realizó otro ELISA Indirecto para determinar la respuesta del Ac_m B2B (sobrenadante del cultivo celular), frente a leche de cabra sometida a diferentes tratamientos térmicos. Los resultados obtenidos (Tabla IV.4.), confirmaron que la antigenicidad de las caseínas de la leche de cabra no resulta afectada por los tratamientos térmicos, como ya se comentó en la sección V.1. de este trabajo.

Finalmente, la especificidad y la posible reactividad cruzada del Ac_m B2B, se analizaron por la técnica del Inmunoblotting. Esta técnica combina la resolución de las proteínas en un gel de electroforesis con la especificidad de su detección por un método inmunoenzimático (ELISA) y se puede utilizar para determinar muchas características de un antígeno proteico como son, su presencia y concentración, el peso molecular de la cadena polipeptídica y la eficiencia de su purificación. El factor que determina el éxito en la utilización de esta técnica es la naturaleza de los epítopos reconocidos por los anticuerpos. La mayoría de las técnicas electroforéticas incluyen la desnaturalización por el calor de la muestra antigénica, por lo que sólo los anticuerpos que reconozcan epítopos resistentes a la desnaturalización podrán unirse a ellos. La mayoría de los anticuerpos policlonales contienen, al menos, algunos anticuerpos de este tipo, pero muchos anticuerpos monoclonales no podrán reaccionar con antígenos desnaturalizados. La sensibilidad de un inmunoblotting depende del método de detección utilizado y la ventaja de la utilización de anticuerpos monoclonales reside en la especificidad de sus interacciones. Otro problema cuando se utilizan anticuerpos monoclonales, es la posibilidad de detectar reacciones cruzadas con otros polipéptidos, debido a que un epítipo puede estar formado por cuatro o cinco aminoácidos y cabe la posibilidad de la existencia de la misma secuencia en otro polipéptido (Harlow y Lane, 1988). Aunque existen una gran variedad de técnicas de inmunoblotting, las más utilizadas se basan en la transferencia electroforética de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Towbin y col., 1979; Burnette, 1981).

En la Figura IV.12. se observa que el Ac_m B2B reconoce sólo las caseínas de la leche de cabra y no las de oveja y vaca. Asimismo, también reconoce las caseínas purificadas por cromatografía de intercambio catiónico correspondientes a la fracción que contiene la

caseína α_{S2} y la que contiene la caseína α_{S1} . La razón de que dicho anticuerpo reconozca también caseínas presentes en la fracción que contiene la caseína α_{S1} , es que dicha fracción, como se aprecia en la electroforesis, se encuentra contaminada con las caseínas α_{S2} , β y κ . Las bandas minoritarias reconocidas, se atribuyen a variantes genéticas o productos de degradación de la caseína α_{S2} . En definitiva, los resultados obtenidos confirman que el Ac_m B2B es monoespecífico de la caseína α_{S2} de la leche de cabra.

V.4. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN MEZCLAS LACTEAS, UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

La detección y cuantificación de un anticuerpo o de un antígeno por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), requiere la utilización de conjugados enzima-proteína. De esta se dividen en métodos directos e indirectos si el anticuerpo se conjuga a un enzima (directo) o bien el complejo antígeno-anticuerpo es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con un enzima (indirecto). Este segundo anticuerpo suelen ser anti-inmunoglobulinas frente al primero o la utilización de la proteína A. Una variación importante de estos dos métodos consiste en la conjugación del anticuerpo con moléculas pequeñas, como la biotina, detectándose entonces la unión antígeno-anticuerpo por compuestos como la estreptavidina. El método directo es sencillo de realizar y requiere menos tiempo que el indirecto, aunque su sensibilidad es menor, disponiendo de la ventaja de la existencia de conjugados comerciales de enzima-anticuerpo y de que el primer anticuerpo no sufre ninguna modificación. Para la mayoría de las aplicaciones, los métodos indirectos son los más utilizados.

En este trabajo, hemos utilizado el método indirecto detectando los complejos antígeno-anticuerpo formados, con un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas de cabra y marcado con el enzima peroxidasa de rábano (Dako). En el caso de los anticuerpos conjugados a la biotina, utilizamos un conjugado comercial de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Dako).

V.4.1. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE CRUDA DE CABRA EN LECHE CRUDA DE OVEJA

Existen muchas variantes de las técnicas inmunoenzimáticas, aunque las más utilizadas son el ELISA Indirecto, Sandwich y Competitivo. En nuestro trabajo, la primera

técnica que utilizamos fue la del ELISA Indirecto clásico ya que es la más sencilla de todas en lo que se refiere a la obtención y preparación de los reactivos utilizados y a su desarrollo en cuatro etapas, con lo que el tiempo requerido para su realización es muy pequeño (4 horas) (Figura II.18.)

En la realización del ELISA Indirecto se utilizó el Ac_m B2B parcialmente purificado con sulfato amónico y un conjugado comercial de antiinmunoglobulinas de ratón marcadas con el enzima peroxidasa de rábano. Como se observa en la Figura IV.13., la respuesta del Ac_m B2B frente a porcentajes crecientes de leche de cabra en las mezclas lácteas, fue lineal, originando una recta de regresión que nos permite detectar y cuantificar de un 0,5 a un 15% de adición de leche de cabra en leche de oveja mediante la expresión: $y = 0,3505 + 0,1138x$, con un coeficiente de regresión (r^2) de 0,996, un coeficiente de regresión ajustado (Adj. r^2) de 0,996 y un valor de $p=0,0001$. El coeficiente de regresión ajustado es el parámetro estadístico más adecuado cuando el número de muestras del que se parte no es muy grande. De la expresión Adj. $r^2 = 0,996$ ($p=0,0001$), se deduce que existe una relación estadística adecuada entre el porcentaje de leche de cabra existente en las muestras y la absorbancia de dichas muestras.

Sin embargo, si los valores de sustitución de leche de oveja por leche de cabra superan el 15%, la fiabilidad del ensayo sería escasa, ya que a partir de este valor los valores de las absorbancias no se incrementan con el porcentaje de sustitución. Por tanto, en los ensayos procuramos ajustar las concentraciones de los reactivos para que fueran eficaces en la detección de un 0,5 a un 15% de sustitución de la leche de oveja por la de cabra. No obstante, porcentajes de sustitución superiores al 15% son poco frecuentes en la industria láctea ya que corresponden a volúmenes que originan productos de características muy distintas a las del producto original, con modificaciones en parámetros que se aprecian organolépticamente. La respuesta inmunológica lineal obtenida en los inmunoensayos es frecuente, dependiendo de la afinidad del anticuerpo por el antígeno y de las concentraciones de los reactivos que intervienen en el ensayo. La respuesta lineal es preferible cuando el antígeno de interés se encuentra en grandes cantidades en las muestras problema, aunque para detectar la presencia de cantidades pequeñas del antígeno buscado se prefiere la respuesta logarítmica.

La técnica del ELISA Indirecto clásico desarrollada es sencilla y rápida, pero presenta el inconveniente de su variabilidad interna, posiblemente, como consecuencia de que no siempre se adsorbe en las placas la misma cantidad de antígeno. Además, resulta poco eficaz en la detección y cuantificación de cantidades pequeñas de sustitución de leche de una

especie animal por otra. Otra característica a considerar en la utilización de este formato ELISA es que las sustancias adsorbidas a los pocillos pueden experimentar alteraciones estructurales derivadas de su unión y los epítomos más inmunógenos serían inaccesibles para su reconocimiento por el anticuerpo.

El ELISA Sandwich es el método más utilizado en la detección y cuantificación de antígenos, debido a su gran especificidad y sensibilidad (Harlow y Lane, 1988). Su especificidad se debe a la utilización de anticuerpos específicos (anticuerpos de captura) que se adsorben a los pocillos de la placa de ELISA capturando los antígenos de la muestra frente a la que se obtuvieron. Al añadir los anticuerpos de detección, estos no se encuentran con una mezcla heterogénea de antígenos sino con los específicos de la muestra a analizar, por lo que se unirán a ellos más fácilmente (Figura II.19.). La mayor ventaja de esta técnica es que el antígeno utilizado no necesita de una purificación previa y, además, al no encontrarse directamente adsorbido a los pocillos de la placa se encontrará en su forma nativa, eliminando las posibles alteraciones conformacionales que pueden ocurrir en el ELISA Indirecto (Hefle, 1995). El mayor inconveniente de esta técnica radica en que no todos los anticuerpos son válidos para proporcionar los resultados deseables y que requiere la utilización de dos anticuerpos que pueden ser dos anticuerpos monoclonales, o bien, un anticuerpo monoclonal y un otro policlonal.

En primer lugar, realizamos el ELISA Sandwich utilizando el Ac_m B2B y el anticuerpo policlonal anti-caseínas de la leche de cabra obtenido de conejos, ambos purificados por precipitación selectiva con sulfato amónico y ambos utilizados como anticuerpos de captura y de detección. Los resultados obtenidos (no mostrados), indicaron que este ensayo no era válido en la detección de leche de cabra en leche de oveja ya que las absorbancias de las muestras problema, con leche de cabra o sin ella, eran iguales. Esto parece deberse, probablemente, a que los anticuerpos policlonales utilizados no estaban purificados por cromatografía de afinidad y por lo tanto reconocían tanto a las caseínas de la leche de cabra como a las de la leche de oveja ya que, al ser especies muy próximas, contienen epítomos comunes.

En segundo lugar, para el desarrollo de esta técnica utilizamos dos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra (B2B y B12B), aunque los resultados obtenidos fueron similares a los descritos previamente. En este caso, el problema reside en que el ELISA Sandwich debe utilizar dos anticuerpos monoclonales que reconozcan epítomos diferentes y, posiblemente, alejados del mismo antígeno, ya que si esto no ocurre, se producirá un solapamiento entre ambos y no será posible la unión de

ambos anticuerpos al mismo antígeno. En definitiva, el ELISA Sandwich tal y como se ha realizado en este trabajo, no permite la detección y cuantificación de la leche de cabra en la de oveja.

Como ya se ha comentado, el ELISA Sandwich es el método de elección en la detección y cuantificación de antígenos de interés, pero si no se encuentran disponibles dos anticuerpos monoclonales que reconozcan epítomos diferentes de un mismo antígeno o de anticuerpos policlonales purificados por cromatografía de afinidad, el siguiente ensayo de elección es el ELISA Competitivo (Harlow y Lane, 1988; Hefle, 1995). El ELISA Competitivo se ha utilizado con éxito en el análisis de moléculas pequeñas tales como pesticidas, toxinas, hormonas y también en la detección y cuantificación de algunas proteínas como la soja (Rittenburg, 1990). Esta técnica tiene dos variantes, basadas en la detección del anticuerpo o del antígeno, siendo esta última la más utilizada en la detección y cuantificación de componentes y contaminantes de los alimentos. En este sistema, una muestra antigénica pura o parcialmente purificada, se adsorbe a los pocillos de las placas de ELISA, mientras la muestra problema conteniendo una concentración desconocida del antígeno se añade mezclada con el anticuerpo. El antígeno existente en la muestra problema competirá con el antígeno inmovilizado en el pocillo por la unión con el anticuerpo y, cuanto mayor sea la concentración antigénica en la muestra problema, menor será la cantidad de anticuerpo que se unirá a la fase sólida. El complejo antígeno-anticuerpo de la fase sólida se detecta por la adición de un conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenido de otra especie animal marcado con un enzima y la cantidad de color observado, es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno existente en la muestra problema o standar (Figura II.20.).

La realización de esta técnica requiere la utilización de anticuerpos monoclonales, específicos para que el antígeno adsorbido y el de la muestra problema compitan por el mismo lugar de unión con el anticuerpo. Para realizar la cuantificación la absorbancia de cada muestra se divide por la absorbancia obtenida con un control negativo (sin muestra problema) y se multiplica por 100 dando el porcentaje de absorbancia, que cuando se resta de 100 obtenemos el valor denominado % de Inhibición (sección IV.5.1.C.).

Otra característica de este tipo de ELISA es la conveniencia de utilizar antígenos puros o parcialmente purificados. Para dotar al ensayo de mayor sensibilidad, utilizamos como antígeno adsorbido al pocillo, las caseínas totales de la leche de cabra y como anticuerpo el Ac_m B2B parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó con un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de

ratón obtenidas de cabra y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano.

Los resultados obtenidos se han descrito en la sección IV.5.1.C. de este trabajo, en los que conviene destacar que la respuesta inmunológica obtenida es de tipo logarítmico, a diferencia de la lineal obtenida con el ELISA Indirecto. Este tipo de respuesta es preferible en la detección y cuantificación de concentraciones pequeñas del antígeno de interés. Así, (Figura IV.14.) se aprecia que para una sustitución del 0,25% de leche de oveja por leche de cabra, el porcentaje de inhibición obtenido es superior al 25%, por lo que esta técnica es más sensible y específica que la del ELISA Indirecto clásico. Sin embargo, al igual que con la técnica anterior, a partir de valores de sustitución superiores al 15% el ensayo no es adecuado. La ecuación resultante de la detección y cuantificación de un 0,25 a un 15 % de leche de oveja por leche de cabra, fue la siguiente: $\log A_{405} = 0,0383 - 0,3831 \log x$, con un coeficiente de regresión (r^2) de 0,976, y un coeficiente de regresión ajustado ($\text{Adj } r^2$) de 0,970 y un valor de $p=0,0001$.

Por tanto, al igual que sucedía con el ELISA Indirecto, la correlación existente entre el incremento de absorbancia y el porcentaje de sustitución de leche de oveja por leche de cabra, es también muy elevada. Por otra parte, al contrario que en el ELISA Indirecto, lo que se adsorbe en los pocillos es una concentración conocida de anticuerpos específicos, en lugar de una muestra antigénica diluida, por lo que la variabilidad intra e interensayos disminuye considerablemente. De lo expuesto, podemos concluir que para la detección y cuantificación del 0,25 al 15% de leche de cabra en leche de oveja, el ELISA Competitivo es el método de elección, debido a su gran sensibilidad.

La conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina y su detección con la estreptavidina, puede amplificar la respuesta inmunológica e incrementar la sensibilidad de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). Esto se debe, a que al encontrarse las inmunoglobulinas unidas a muchas moléculas de biotina, el conjugado de estreptavidina-peroxidasa encuentra más lugares de anclaje a los anticuerpos, que cuando se utiliza como conjugado los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de especie marcadas con el mismo enzima. Por este motivo intentamos desarrollar y poner a punto un ELISA Indirecto en el que el Ac_m B2B se conjugó con la biotina. Sin embargo, en nuestro caso la biotinización del Ac_m B2B en lugar de amplificar la respuesta, provocó una disminución en su capacidad de reconocimiento de las caseínas de la leche de cabra. Este resultado puede deberse a que para la conjugación utilizamos un éster de la biotina, denominado biotinil-N-hidroxisuccinimida (BHNS), que reacciona con el anticuerpo a través de los grupos amino libres de las proteínas, normalmente los del aminoácido lisina. Si la unión

con el anticuerpo se realiza a través de aminoácidos esenciales para la actividad del anticuerpo (los lugares de combinación con el antígeno), la biotinización puede disminuir o destruir la actividad de éste (Harlow y Lane, 1988).

De los resultados obtenidos, se deduce que con la utilización del Ac_m B2B y las técnicas del ELISA Indirecto y Competitivo empleadas en este trabajo, es posible la detección y cuantificación de la sustitución de la leche de oveja por leche de cabra, teniendo como límite máximo un 15% de sustitución y como límite inferior un 0,5% (Indirecto), mientras en la detección y cuantificación de porcentajes pequeños de sustitución, el ELISA Competitivo es el método más sensible y fiable.

V.4.2. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE CRUDA DE CABRA EN LECHE CRUDA DE VACA

La detección y cuantificación de leche cruda de cabra en mezclas con leche cruda de vaca, se realizó utilizando el Ac_m B2B purificado parcialmente por precipitación selectiva con sulfato amónico y las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA Indirecto y Competitivo.

Del análisis de las mezclas experimentales de leche y utilizando la técnica del ELISA Indirecto (Figura IV.15.), obtuvimos una respuesta lineal en la detección y cuantificación del 0,5 al 15% de leche de cabra en leche de vaca y cuya ecuación fue la siguiente: $A_{405} = 0,4211 + 0,1122 x$, con un coeficiente de regresión (r^2) de 0,981, y un coeficiente de regresión ajustado (Adj. r^2) de 0,977 y un valor de $p=0,0001$. Utilizando la técnica del ELISA Competitivo, la representación gráfica de la relación entre el porcentaje de inhibición y los de sustitución del 0,25 al 15% de leche de vaca por leche de cabra, originó una respuesta logarítmica (Figura IV.16), cuantificable mediante la ecuación: $\log A_{405} = 0,4290 - 0,3360 \log x$, con un coeficiente de regresión (r^2) de 0,975, y un coeficiente de regresión ajustado (Adj r^2) de 0,970 y un valor de $p=0,0001$.

Debido a la analogía existente entre las leches de oveja y cabra, se pensó que su diferenciación sería más difícil que en el caso de la leche de vaca, aunque los resultados que se describen en esta sección determinaron que la cuantificación de leche de cabra en leche de oveja (Figuras IV.13. y IV. 14.), es igual de precisa que cuando el método se utiliza en la detección y cuantificación de la leche de cabra en leche de vaca (Figuras IV.15. y IV.16.).

Por tanto, podemos afirmar que tanto el ELISA Indirecto (detección del 0,5 al 15%) como el Competitivo (detección del 0,25 al 15%), desarrollados en este trabajo, permiten la

detección y cuantificación de la sustitución de leche de vaca por la de cabra.

V.4.3. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN LECHE CRUDA DE OVEJA

Como ya se ha comentado en la sección V.1., las caseínas de la leche presentan una elevada termoestabilidad. Puesto que utilizamos la caseína α_{S2} de la leche de cabra para la producción del Ac_m B2B, consideramos de interés analizar la influencia de los tratamientos térmicos en la capacidad de reconocimiento de este Ac_m por las caseínas frente a las que se obtuvo. En una primera aproximación, enfrentamos el Ac_m B2B a la leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra, determinando que éste era termoestable (Tabla IV.4.). No obstante, permanecía por determinar la capacidad de reconocimiento de este Ac_m para la leche de cabra sometida a los diferentes tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, en mezclas con leche de oveja y vaca.

El tratamiento térmico de la leche origina cambios en la estructura de la micela de caseína y en, un principio, las caseínas κ y α_{S2} se asocian a la β -lactoglobulina. Si el tratamiento térmico es más intenso, se producen cambios en los aminoácidos de las caseínas, como la pérdida de fosfato de los radicales fosfoserina, la formación de lisoalanina y la aparición de productos de la reacción de Maillard. Cuando el tratamiento térmico se prolonga a temperaturas elevadas, se puede producir una ligera proteólisis de las caseínas como lo indica el incremento en los niveles de proteasa-peptona y de nitrógeno no proteico de la leche (Law y col., 1994).

En la detección y cuantificación de la leche de cabra tratada térmicamente en mezclas con leche de oveja, utilizamos las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA Indirecto y Competitivo. Los resultados obtenidos se han descrito en la sección IV.5.3., obteniendo con el ELISA Indirecto, tanto para la leche pasteurizada (Figura IV.17.) como para la esterilizada (Figura IV.18.) de cabra, una respuesta lineal con una ecuación que nos permite detectar la presencia del 0,5 al 15% de leche pasteurizada (Adj. $r^2= 0,979$, $p=0,0001$) o esterilizada (Adj. $r^2= 0,960$, $p=0,0001$) de cabra, en la leche de oveja.

En la Figura IV.19. se muestran los resultados obtenidos con el ELISA Indirecto, para la detección y cuantificación de leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra en leche de oveja. En ella se aprecia, que los valores de absorbancia obtenidos cuando la leche de cabra se somete a pasteurización son superiores a los obtenidos con la leche cruda, mientras

que con la leche esterilizada, los valores de absorbancia disminuyen respecto de los de la leche cruda.

Recientemente, Law y col. (1994) estudiando los cambios estructurales de las caseínas sometidas a tratamientos térmicos, han determinado que éstos solamente se producen cuando la leche se calienta durante 5 minutos a temperaturas superiores a 110 °C. Por tanto, la pasteurización de la leche (62 °C, 30 minutos) no afectaría a la estructura de las caseínas. El que los valores de absorbancia sean más altos que con los de la leche cruda se debe, probablemente, a que con el calor la cadena proteínica se vuelve más laxa (se abre más) y los epítomos quedarían más expuestos para su reconocimiento por el anticuerpo. Por el contrario, la esterilización de la leche (121 °C, 20 minutos), provoca cambios estructurales en las moléculas de caseína, lo que dificulta el reconocimiento de sus correspondientes epítomos por el anticuerpo.

La utilización del ELISA Competitivo, permitió la obtención de dos ecuaciones para la útiles en la detección y cuantificación del 0,25 al 15% de sustitución de leche de oveja por leche pasteurizada de cabra (Figura IV.20., Adj. $r^2 = 0,971$, $p = 0,0001$) o por leche esterilizada de cabra (Figura IV.21., Adj. $r^2 = 0,980$, $p = 0,0001$). Las diferencias que se observan con respecto al ELISA Indirecto (Figuras IV.17. y IV.18.), son las que se observaron en el caso de la leche cruda (sección V.4.1.). El ELISA Competitivo proporciona una respuesta logarítmica que nos permite detectar y cuantificar la presencia del 0,25% de leche pasteurizada o esterilizada de cabra en la leche de oveja.

La representación de los porcentajes de inhibición obtenidos para la leche cruda, pasteurizada y esterilizada de cabra, se muestran en la Figura IV.22. Como en el caso del ELISA Indirecto, se aprecian diferencias en los valores de los tres tipos de leche aunque éstas son mínimas comparadas con las obtenidas con el ELISA Indirecto. Estos resultados confirman la mayor sensibilidad del ELISA Competitivo en la detección y cuantificación de la presencia de leche cruda, pasteurizada o esterilizada de cabra en la leche de oveja.

V.4.4. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN LECHE CRUDA DE VACA

La detección y cuantificación de leche pasteurizada o esterilizada de cabra en mezclas con leche cruda de vaca, se realizó utilizando el Ac_m B2B purificado parcialmente por precipitación con sulfato amónico y las técnicas inmunoenzimáticas del ELISA Indirecto y

Competitivo.

Los resultados obtenidos utilizando la técnica del ELISA Indirecto se muestran en las figuras IV.23. y IV.24. En ambos casos se obtuvo una respuesta lineal, lo que permite detectar y cuantificar de un 0,5 % a un 15 % de sustitución de leche de oveja por leche pasteurizada de cabra (Adj. $r^2= 0,986$ $p=0,0001$) o por leche esterilizada de cabra (Adj. $r^2= 0,992$ $p=0,0001$) (Figura IV.20.). En la figura IV.25. se comparan los valores de absorbancia obtenidos con los tres tipos de leche de cabra utilizada en las mezclas lácteas. Como sucedía en el caso de las mezclas con leche de oveja, los valores de absorbancia cuando se utiliza la leche pasteurizada de cabra son mayores que con la leche cruda, mientras que con la leche de cabra esterilizada los valores de absorbancia disminuyen.

La respuesta que se obtiene al utilizar el ELISA Competitivo en la detección y cuantificación de leche pasteurizada (Figura IV.26.) o esterilizada (Figura IV.27.) de cabra en leche de vaca fue del tipo logarítmico. Las ecuaciones obtenidas permiten detectar y cuantificar la presencia del 0,25 hasta el 15% de leche pasteurizada (Adj. $r^2= 0,970$, $p=0,0001$) y esterilizada (Adj. $r^2= 0,974$, $p=0,0001$) en la leche de vaca. La comparación de la relación entre los porcentajes de inhibición y los porcentajes de sustitución obtenidos para la leche cruda de cabra o la sometida a pasteurización o esterilización (Figura IV.28.), permite comprobar que existen diferencias en los valores de inhibición (leche pasteurizada de cabra > leche cruda de cabra > leche esterilizada de cabra), pero estas son menores que las obtenidas con utilizar el ELISA Indirecto.

V.5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y VACA, UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

El empleo de las técnicas inmunológicas del ELISA Indirecto y Competitivo en la detección y cuantificación de leche de cabra en leche de oveja y vaca, dieron resultados muy satisfactorios, por lo que se procedió a utilizarlas en la detección y cuantificación de la leche de cabra en los quesos madurados de oveja y vaca.

V.5.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA

Como antígenos se utilizaron las tres mezclas de quesos realizadas con queso fresco, queso tierno y queso madurado de cabra en queso de oveja. El objetivo era determinar si el reconocimiento de la leche de cabra por el Ac_m B2B se modificaba por los cambios de las caseínas durante la maduración de los quesos. La primera técnica utilizada fue la del ELISA Indirecto clásico y los resultados se muestran en las Figuras IV.29., IV.30. y IV.31. En los tres casos, la respuesta del Ac_m B2B a la presencia creciente de leche de cabra produce un incremento logarítmico de la absorbancia entre los porcentajes del 1 y 25% de sustitución del queso de oveja por los de cabra. Las ecuaciones de regresión obtenidas mostraron un coeficiente de regresión lineal suficientemente elevado y significativo (queso fresco : Adj. $r^2 = 0,990$, $p = 0,0001$; queso tierno: Adj. $r^2 = 0,989$, $p = 0,0001$; queso madurado: Adj. $r^2 = 0,936$, $p = 0,0001$), como para afirmar que también en este caso existe una gran correlación entre el aumento de absorbancia y el del porcentaje de sustitución del queso de oveja por queso de cabra.

Cuando se comparan los resultados correspondientes a las tres mezclas (Figura IV.32.), se aprecia que los valores de absorbancia obtenidos son ligeramente superiores en la mezcla con queso fresco que con queso tierno. Asimismo, los valores de absorbancia obtenidos con el queso madurado que con el queso tierno. Por tanto, parece ser que el reconocimiento de las caseínas de cabra por el Ac_m B2B en el caso de las mezclas de quesos resulta afectada (dependiendo del período de maduración del queso), aunque las diferencias encontradas son muy pequeñas. La respuesta logarítmica obtenida, contrasta con la respuesta lineal observada en la detección de leche de cabra en leche de oveja (Figuras IV.19.) y puede deberse a la mayor dificultad del Ac_m B2B para reconocer las caseínas de la leche de cabra, en una muestra antigénica más compleja como es el queso.

Los resultados obtenidos al utilizar la técnica del ELISA Competitivo (Figuras IV.33., IV.34. y IV.35.), permitieron la obtención de ecuaciones de regresión con buenos índices de correlación (queso fresco : Adj. $r^2 = 0,980$, $p = 0,0001$; queso tierno: Adj. $r^2 = 0,978$, $p = 0,0001$; queso madurado: Adj. $r^2 = 0,956$, $p = 0,0001$), para la detección y cuantificación del 0,5 al 25% de queso de cabra en queso de oveja. En la Figura IV.36., se observa que las diferencias entre los porcentajes de inhibición obtenidos para cada una de las mezclas, son menores que los obtenidos al utilizar el ELISA Indirecto.

Por lo tanto, para la detección y cuantificación del 0,5% al 25% de queso de cabra en

queso de oveja, el ELISA Competitivo es el método de elección por su mayor sensibilidad.

V.5.1. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE CABRA EN QUESOS MADURADOS DE VACA

Para determinar la capacidad de reconocimiento del Ac_m B2B del queso fresco, tierno y madurado de cabra en mezclas con queso de vaca, se utilizó primero la técnica del ELISA Indirecto. Al relacionar los porcentajes de absorbancia obtenidos con los porcentajes crecientes de sustitución de queso de vaca por queso fresco (Figura IV.37., Adj. $r^2=0,993$, $p=0,0001$), queso tierno (Figura IV.38. Adj. $r^2=0,989$, $p=0,0001$) y queso madurado (Figura IV.39. Adj. $r^2=0,958$, $p=0,0001$) de cabra y como sucedió en las mezclas con queso de oveja, se obtuvo una respuesta logarítmica. De los resultados obtenidos se deduce que esta técnica permite la detección e identificación del 1 al 25% de queso de cabra en queso de vaca. Las diferencias observadas cuando se comparan las tres mezclas (Figura IV.40.), son escasas.

Con la técnica del ELISA Competitivo (Figuras IV.41., IV.42. y IV.43.), se consiguió detectar y cuantificar del 0,5 al 25% de queso de vaca por el de cabra y la correlación de los resultados obtenidos se consideró adecuada (queso fresco : Adj. $r^2=0,933$, $p=0,0001$; queso tierno: Adj. $r^2=0,976$, $p=0,0001$; queso madurado: Adj. $r^2=0,931$, $p=0,0001$). Además, las diferencias observadas en los porcentajes de inhibición de las tres mezclas son mínimas (Figura IV.44), al igual que sucedía con el queso de oveja, por lo que la técnica del ELISA Competitivo es la más adecuada para la detección y cuantificación de la sustitución del 0,5-25% de queso de vaca por el de cabra.

V.6. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO CON LOS DE OTROS INVESTIGADORES

En la introducción de este trabajo, se revisan los principales métodos disponibles para la identificación y cuantificación de la leche de diversas especies animales en mezclas lácteas frescas y quesos madurados. La mayor parte de los estudios desarrollados se refieren a la detección de leche de vaca en la de oveja y cabra. Sin embargo, en los países mediterráneos, la detección de leche de cabra y su determinación cuantitativa en leche y en quesos de oveja, posee una enorme importancia económica. Debido a la gran analogía entre las leches de oveja y cabra, su diferenciación es más difícil que en el caso de la de vaca, aunque no por ello han dejado de desarrollarse diversas técnicas analíticas.

Así, Assenat (1967) fraccionando las caseínas por electroforesis en geles de poliacrilamida, detecta un 2% de leche de vaca en la de oveja, señalando que dada la similitud de las caseínas α_s de las leches de cabra y oveja, esta técnica sólo permite la detección y cuantificación de leche de cabra en la de oveja para porcentajes de sustitución superiores al 30%. La identificación y cuantificación de las proteínas del suero de la leche por electroforesis en geles de poliacrilamida (Amigo y col., 1989), permite la detección del 1-2% de leche de vaca o de cabra en quesos madurados de oveja. Esta técnica es oficial en España (B.O.E., 30/X/91) para la detección de leche de cabra en la de oveja (límite de detección del 2 %) y de leche de cabra en el queso de oveja (límite de detección del 3%).

Ruiz y Santillana (1986) separando las proteínas del suero de la leche por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida, detectan y cuantifican desde un 3% de leche de cabra en la de oveja. Ortín y col. (1992a y b) desarrollando la misma técnica en un equipo automatizado Phast-System, determinan porcentajes del 5 al 40% de leche de vaca, cabra y oveja en quesos de mezcla y de maduración corta, con una gran precisión. Asimismo, evaluando el punto isoelectrico de la caseína κ de la leche de las tres especies, concluyen que las para- κ -caseínas constituyen un marcador potencial y podrían utilizarse en la identificación y cuantificación de la leche de vaca, oveja y cabra en mezclas de quesos. No obstante, a pesar de su sensibilidad, los métodos electroforéticos presentan el inconveniente de un coste elevado y de requerir mucho tiempo para completar los análisis.

En cuanto a los métodos inmunológicos, uno de los primeros empleados en la detección de la leche de cabra en mezclas lácteas, fue el de la inmunoprecipitación en medio líquido (Pinto, 1966), en el que empleando inmunosueros anti-proteínas sanguíneas de la leche de cabra, neutralizadas con las proteínas sanguíneas de las especies con las que presentaba reacciones cruzadas, se consigue la detección de un 5% de leche de cabra en la de oveja. Sin embargo, el método no es válido cuando la leche se somete a temperaturas superiores a las de pasteurización. De los métodos inmunológicos, el de la inmunodifusión radial (Levieux, 1977) es el que más se ha empleado en la detección y cuantificación de la leche de cabra en mezclas lácteas, con un límite de detección del 1%, pero este método presenta la limitación de que en las leches sometidas a tratamientos térmicos superiores a 75°C durante 30 segundos debe aplicarse un factor de corrección, lo mismo que en los quesos. Amigo y col. (1989), al comparar la inmunodifusión radial de las proteínas del suero de la leche, con la electroforesis en geles de poliacrilamida de las mismas proteínas indican que ambos métodos permiten la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas y en quesos elaborados con leche de oveja, si bien, el método electroforético cuantifica mejor la composición real de la mezcla que el inmunológico. A pesar de sus

limitaciones, la inmunodifusión radial es un método oficial para la detección de leche de cabra en la de oveja con un límite de detección del 1% (B.O.E., 30/X/91). La técnica del inmunodotting empleando inmunosueros anti-inmunoglobulinas sanguíneas de cabra obtenidas de carneros ha sido utilizada por Pérez y col. (1992), como un método "cualitativo" en la detección de leche de cabra en la de oveja.

García y col. (1993; 1994) empleando un inmunosero anti-proteínas séricas de la leche de cabra, han desarrollado y puesto a punto dos métodos inmunoenzimáticos (ELISA), Indirecto y Sandwich, que permiten la detección y cuantificación de un 1% de leche de cabra en leche de oveja. El inconveniente de ambos es que el inmunosero descrito no permite la detección y cuantificación de la leche de cabra en los quesos madurados de oveja, ya que las proteínas séricas son muy sensibles a los tratamientos térmicos y se encuentran en concentraciones pequeñas en los quesos madurados. Por este motivo, Rodríguez y col. (1991; 1992) utilizaron inmunosueros frente a las caseínas de la leche de cabra purificados por cromatografía de afinidad, biotinizados y neutralizados, para su utilización en diversas técnicas inmunoenzimáticas. Así, utilizando un ELISA Indirecto detectan y cuantifican de un 1 a un 25% de leche de cabra en leche y quesos madurados de oveja. Si el sistema utilizado es un ELISA Sandwich, es posible la detección y cuantificación de un 1 a un 100% de leche de cabra en la leche y quesos de oveja. Sin embargo, la purificación de los anticuerpos policlonales por afinidad es larga y costosa y su disponibilidad es limitada.

De lo expuesto sobre las técnicas empleadas en la detección y cuantificación de la leche de cabra en leche y quesos de oveja, puede concluirse que las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) desarrolladas en este trabajo, poseen una sensibilidad adecuada. Empleando el Ac_m B2B específico de las caseína α_{s2} de la leche de cabra, la técnica del ELISA Indirecto permite la detección y cuantificación de la sustitución del 0,5 al 15% de leche de oveja por leche de cabra y del 1 al 25% de sustitución de queso de oveja por queso de cabra. no obstante, con el ELISA Competitivo desarrollado, el rango de detección y cuantificación de la leche de cabra se amplía del 0,25 al 15% en las mezclas lácteas y del 0,5 al 25% en los quesos. Además, estos métodos ofrecen frente a los descritos previamente, las ventajas de disponer de una fuente ilimitada de anticuerpos, requieren solamente cuatro (Indirecto) o 5 (Competitivo) horas para su realización, su coste económico es pequeño y permiten analizar un gran número de muestras en una sola placa de ELISA.

Debido a la escasa información existente sobre el desarrollo de técnicas analíticas para

detectar y cuantificar la presencia de leche de cabra en leche y quesos de vaca y como se han obtenido resultados similares a los descritos con la leche de oveja, es posible concluir que los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) desarrollados en este trabajo, son también adecuados para la detección y cuantificación de la leche de cabra en leche y quesos de vaca.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1. De los métodos cromatográficos empleados para el fraccionamiento de las caseínas de la leche de cabra, que han sido los de cromatografía líquida rápida (FPLC) de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-celulosa y cromatografía de intercambio catiónico en una matriz de S-Sepharose Fast-Flow, la cromatografía de intercambio catiónico es la que ha permitido una mejor separación de las caseínas en sus cuatro componentes mayoritarios (α_{s1} , α_{s2} , β y κ).
2. La caracterización inmunológica parcial de las fracciones caseínicas purificadas por cromatografía líquida rápida (FPLC) de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico en una matriz de S-Sepharose Fast-Flow, utilizando anticuerpos policlonales específicos de la leche de cabra y un ELISA Indirecto, indicó que la fracción que contenía la caseína α_{s2} obtenida por cromatografía de intercambio catiónico era la fracción más inmunógena, probablemente porque es la que posee el mayor número de epítomos específicos de las caseínas de la leche de cabra.
3. El bazo del ratón inmunizado con la fracción que contenía la caseína α_{s2} de la leche de cabra y que mostraba el mayor título de anticuerpos frente a las caseínas de la leche de cabra, se utilizó para la fusión de los linfocitos con células de mieloma. La eficacia de la fusión celular fue mayor del 50%: de 400 pocillos que mostraban hibridomas, el 25% producían anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra.
4. La metodología de producción de hibridomas permitió la identificación y selección de 8 líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales específicos de la leche de cabra, denominados: A1H, B2B, B12B, C2H, C6C, F4E y A6F.
5. Los estudios realizados para evaluar la actividad y especificidad de los 8 anticuerpos monoclonales citados indicaron que, el Ac_m B2B procedente del sobrenadante del cultivo celular era monoespecífico frente a la caseína α_{s2} de la leche de cabra, además de mostrar la mayor reactividad frente a dicha leche.
6. La especificidad del Ac_m B2B procedente del sobrenadante del cultivo celular frente a las caseínas y a la leche cruda de cabra fue mayor que la presentada por el mismo Ac_m existente en el líquido ascítico, por lo que se seleccionó para su

utilización posterior en la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas y quesos de diversos tipos, empleando técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

7. De las técnicas inmunoenzimáticas desarrolladas en este trabajo, que fueron un ELISA Indirecto, Sandwich y Competitivo, así como un ELISA Indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina, el ELISA Competitivo resultó ser el más eficaz y sensible en la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas y quesos.
8. Utilizando el Ac_m B2B y la técnica del ELISA Indirecto, es posible detectar y cuantificar porcentajes de sustitución del 0,5 al 15% de leche de oveja o vaca por leche de cabra y del 1 al 25% de queso de oveja o vaca por queso de cabra. Sin embargo, la sensibilidad del método es insuficiente para detectar concentraciones menores.
9. Utilizando el Ac_m B2B y la técnica del ELISA Competitivo, es posible detectar y cuantificar porcentajes de un 0,25% a un 15% de sustitución de leche de oveja o vaca por leche de cabra y del 0,5 al 25% de queso de oveja o vaca por queso de cabra. La sensibilidad del método recomienda su empleo cuando los porcentajes de sustitución de las leches de oveja o vaca por la de cabra son pequeños.
10. La detección y cuantificación de leche de cabra utilizando el Ac_m B2B y el ELISA Competitivo, no resulta afectada significativamente por los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización a los que se somete la leche de cabra, ni por los diferentes períodos de maduración de los quesos de cabra utilizados en la preparación de las mezclas de quesos.

CAPITULO VII

TRABAJO FUTURO

Los resultados de este trabajo indican que el empleo de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la fracción que contiene la caseína α_{S2} de la leche de cabra, permiten el reconocimiento de epítomos específicos de las caseínas de la leche de cabra. Asimismo, mediante el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) adecuadas, estos anticuerpos monoclonales son útiles en la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas y quesos madurados con leches de otras especies.

Debido a que el empleo de anticuerpos monoclonales presenta el inconveniente de la inestabilidad genética de los hibridomas productores de los mismos, así como de su pobre viabilidad celular y de la posibilidad de su pérdida cuando se almacenan y conservan a temperaturas bajas, una de las alternativas frente a este problema, consiste en la obtención y producción de anticuerpos recombinantes utilizando técnicas de Biología Molecular, basadas en la clonación de las inmunoglobulinas o anticuerpos de interés en vectores genéticos adecuados y en su expresión en bacterias genéticamente modificadas.

Estos avances combinan la capacidad de expresar proteínas de células eucariontes en bacterias con el aislamiento y amplificación de los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con sistemas de selección que permiten la identificación y aislamiento de los anticuerpos de una forma más sencilla y rápida que la seguida en la selección de los anticuerpos monoclonales. Las ventajas de la utilización de bacterias genéticamente manipuladas en la síntesis de anticuerpos, son obvias en lo que se refiere a la estabilidad genética de esta función, al almacenamiento y conservación de las bacterias a temperaturas menores y a su facilidad de transporte, sin los problemas de viabilidad y mortalidad celular propios de las células eucariontes.

Los anticuerpos recombinantes, obtenidos por manipulación genética, presentan varias ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales como son: 1) el tiempo necesario para su obtención es menor; 2) mayor capacidad para localizar epítomos que son inaccesibles para las grandes moléculas de inmunoglobulinas; 3) la posibilidad de producción de fragmentos fusionados a un enzima o a cualquier otra proteína, con una función complementaria a la del reconocimiento del antígeno; 4) la posibilidad de prescindir de la inmunización de animales de experimentación y 5) permiten la obtención de reactivos de afinidad y especificidad precisas, mediante la utilización de técnicas que modifican la estructura y características del lugar de unión del anticuerpo con el antígeno.

Como trabajo futuro sería conveniente la utilización de esta metodología para asegurar la estabilidad genética de los hibridomas ya existentes. Por ello, se propone la utilización de

los hibridomas generados en este trabajo en la obtención de anticuerpos recombinantes frente a las caseínas de la leche de cabra, para su utilización posterior en la detección y cuantificación de leche de cabra en mezclas lácteas y quesos. Para conseguir este objetivo, es conveniente seguir el siguiente esquema de trabajo:

1. Extracción del mRNA de los hibridomas de interés y obtención del DNA complementario.
2. Amplificación de los genes de las inmunoglobulinas de interés, empleando cebadores adecuados y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
3. Clonación de las secuencias V_H (cadena pesada de la región variable) y V_L (cadena ligera de la región variable) responsables del reconocimiento antigénico de los Ac_m producidos, en en los vectores genéticos adecuados .
4. Introducción del vector en hospedadores bacterianos adecuados, como células de E. coli genéticamente modificadas, que permiten la expresión y secreción al exterior de las cadenas peptídicas que reconocen a los antígenos de interés.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- ADDEO, F., SOULIER, S., PELISSIER, J. P., CHOBERT, J. M., MERCIER, J. C. Y RIBADEAU-DUMAS, B. (1978) Preparation and fractionation of goat κ -casein: analysis of the glycan and peptide components. *J. Dairy Res.* **45**, 191-196.
- ADDEO, F., ANELLI, G. y CHIANESE, L. (1986) Gel isoelectric focusing of cheese proteins to detect milk from different species in mixture. *Bull. Int. Dairy Fed.* **202**, 191-192.
- ADDEO, F., MAURIELLO, R. y DI LUCCIA, A. (1988) A gel electrophoretic study of caprine casein. *J. Dairy Res.* **55**, 413-421.
- ADDEO, F., MOIO, L. y CHIANESE, L. (1989a) Detection of bovine milk in ovine milk or cheese by gel isoelectric focusing of β -lactoglobulin: Applications and limitations. *Ital. J. Food Sci.* **1**, 45-52.
- ADDEO, F., CHIANESE, L. y MOIO, L. (1989b) Detection of bovine, caprine, ovine and water buffalo's milk in mixtures by gel electrophoresis of caseins: A review. Int. Dairy Fed. Group A7. Ewes and goat milk. *Int. Dairy Fed. Brussels*.
- ADDEO, F., MAURIELLO, L., MOIO, L., LAEZZA, P., CHIANESE, L. y DI LUCCIA, A. (1992) Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunological and chromatographic techniques. *Milchwiss.* **47**, 283-287.
- AIMUTIS, W. R. y EIGEL, W. N. (1982) Identification of λ -casein as plasma-derived fragments of bovine α_{s1} -casein. *J. Dairy Sci.* **65**, 175-181.
- ALAIS, C. y JOLLES, P. (1967) Isolation, purification and analysis of two κ -casein-like fractions from sheep casein. *J. Dairy Res.* **50**, 1955-1960.
- ALEXANDER, L. J., HAYES, G., BAWDEN, W., STEWART, A. F. y McKINLAY, A. G. (1993) Complete nucleotide sequence of the bovine β -lactoglobulin gene. *Anim. Biotech.* **4**, 1-10.
- ALLEN, J.C. (1990) The value of immunoassays to food analysis. En *Development and Application of Immunoassay for Food Analysis*. J. H. Rittenburg (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 59-80.

- AMIGO, L., SANTA MARIA, G., GONZALEZ LLANO, D. y RAMOS, M. (1986) Polyacrilamide gel electrophoresis of whey proteins in cheeses made from milk of different species. *XXII Int. Dairy Congress*. La Haya **152**, pp: 28.
- AMIGO, L. (1989a) Proteínas de la leche de vaca, oveja y cabra. Estudio comparativo. *Alim. Equip. Tecnol.* **8**, 211-221.
- AMIGO, L. (1989b) Fenómenos de coagulación de la leche y su influencia en quesos. *Alim. Equip. Tecnol.* **4**, 157-164.
- AMIGO, L., IBÁÑEZ, I., FERNANDEZ, G., SANTA MARIA G., y RAMOS, M. (1989) Comparison of an electrophoretic and an immunological method for the determination of goat and cow milk in cheese. *Milchwiss.* **44**, 215-218.
- AMIGO, L., RAMOS, M., MARTIN-ALVAREZ, P. J. y BARBOSA, M. (1991) Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *J. Dairy Sci.* **74**, 1482-1490.
- AMIGO, L., RAMOS, M., CALHAN, L. y BARBOSA, M. (1992) Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing, and immunodiffusion in determinations of cow's and goat's milk in Serra de Estrela cheeses. *Lait* **72**, 95-101.
- ANDREWS, A. T. (1981) *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- ANDREWS, A. T., TAYLOR, M. D. y OWEN, A. J. (1985) Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **348**, 177-185.
- ANGUITA, G., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., HAZA, A. I., GONZALEZ, I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1995a) Immunological characterization of bovine caseins fractionated by fast protein liquid chromatography. *Milchwiss.* (en prensa)
- ANGUITA, G., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., HAZA, A. I., GONZALEZ, I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1995b) Indirect ELISA for detection of cow's milk in ewe's and goat's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *J. Dairy Res.* (en prensa)

- ANGUITA, G., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., HAZA, A. I., GONZALEZ, I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1995c) Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *J. Food Prot.* (en prensa)
- ANIFANTAKIS, E. M. (1986) Physico-chemical properties of ewe's milk compared to cow's milk. *Int. Dairy Fed. Doc.* **202**, 42-54.
- ANNAN, W. D. y MANSON, W. (1969) Fractionation of the α_s -casein complex of bovine milk. *J. Dairy Res.* **36**, 259-268.
- ANONIMO (1993) Quesos de España con denominación de origen y genérica. *ILE* **169**, 49-56.
- AOKI, T., TOYOOKA, K. y KAKO, Y. (1985) Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of α_{s2} -casein. *J. Dairy Sci.* **68**, 1624-1629.
- ARANDA, P., ORIA, R. y CALVO, M. (1988) Detection of cow's milk in ewe's milk by an immunodotting method. *J. Dairy Res.* **55**, 121-124.
- ARANDA, P., SANCHEZ, L., PEREZ, M. D., ENA, J. M., PUYOL, P., ORIA, R. y CALVO, M. (1993) Rapid immunoenzymatic method for detecting adulteration in ewe's milk. *Food Control* **4**, 101-104.
- ASCHAFFENBURG, R. (1963) Preparation of β -casein by a modified urea fractionation method. *J. Dairy Res.* **30**, 259-260.
- ASCHAFFENBURG, R. (1968) Review of the progress of dairy science. Section G. Genetics. Genetic variants of milk proteins: Their breed distribution. *J. Dairy Res.* **35**, 447-460.
- ASCHAFFENBURG, R. y DANCE, J. E. (1968) Detection of cow's milk in goat's milk by gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* **35**, 383-384.
- ASSENAT, L. (1967) Contribution a l'etude d'une methode d'identification des laits et fromages au moyen de l'electrophorese sur gel de polyacrilamide. *Lait* **47**, 393-344.

- ASSENAT, L. (1985) Le lait de Brevis. Composition et Propriétés. En: *Lait et Produit Laitiers*. Vol. I. F. M. Luquet (ed.), Technique et Documentation, Lavoisier, París. pp: 281-346.
- ASSENAT, L. (1991) Leche de oveja. Composición y propiedades. En *Leche y Productos Lácteos*. Vol. I. F. M. Luquet (ed.), Acribia, Zaragoza. pp: 277-339.
- BARBOSA, M. y GONÇALVES, I. (1985) *Seminario Internacional sobre producción y utilización de leches de oveja y cabra*, Atenas, Sesión V.
- BARREFORS, P., EKSTRAND, B., FAGERSTAM, L., LARSSON-RAZNIKIEWICZ, M., SCHAAR, J. y STEFFNER P. (1985) Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwiss.* **40**, 257-260.
- BARRON, L. J. R., HIERRO, M.T.G. y SANTA MARIA, G. (1990) HPLC and GLC analysis of the glyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. *J. Dairy Res.* **57**, 517-526.
- BENASSI, R. (1963) Sulla composizione del grasso di latte di pecora. *Latte* **36**, 468-470.
- BERNHAEUER, H., BAUDNER, S. y GUNTHER, H. O. (1983) Immunological detection of proteins of cow milk in sheep or goat milk and sheep or goat milk and cheese with a specific immunoglobulin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **177**, 8-10.
- BEZKOROVAINY, A. (1965) Comparative study of the acid glycoproteins isolated from bovine serum colostrum and milk whey. *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 558-567.
- BEZKOROVAINY, A. (1967) Physical and chemical properties of bovine milk and colostrum whey M-1 glycoproteins. *J. Dairy Sci.* **50**, 1368-1372.
- BIRKJÆR, H. y JOHNK, P. (1985) Technological suitability of calf rennet substitutes. *Int. Dairy Fed. Bull. Doc.* **194**, 36-48.
- BONSING, J. y MACKINLAY, A. G. (1987) Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J. Dairy Res.* **54**, 447-461.
- BONSING, J., RING, J. M., STEWART, A. F. y MACKINLAY, A. G. (1988)

- Complete nucleotide sequence of the bovine β -casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.* **41**, 527-537.
- BOULANGER, A., GROSCLAUDE, F. y MAHÉ, M.F. (1984) Polymorphism of caprine (*Capra Hircus*) α_{S1} - and α_{S2} -caseins. *Génét. Sélect. Évol.* **16**, 157-175.
- BOUNIOL, C., BRIGNON, G., MAHÉ, M. F. y PRINTZ, C. (1993) Characterization of goat allelic α_{S2} -casein A and B. Another evidence of the phosphorylation code of caseins. *Protein Seq. Data Anal.* **5**, 213-218.
- BRIGNON, G., RIBADEAU DUMAS, B. y MERCIER, J. C. (1976) Primary elements of the primary structure of α_{S2} -bovine casein. *FEBS Lett.* **71**, 111-116.
- BRIGNON, G., RIBADEAU DUMAS, B., MERCIER, J. C., PELISSIER, J. P., y DAS, B. C. (1977) Complete amino acid sequence of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Lett.* **76**, 274-279.
- BRIGNON, G., MAHÉ, M. F., GROSCLAUDE, F. y RIBADEU DUMAS, B. (1989) Sequence of caprine α_{S1} -casein and characterization of those of its genetic variants wich are synthesized at a high level α_{S1} -CnA, B & C. *Protein Seq. Data Anal.* **2**, 181-188.
- BRIGNON, G., MAHÉ, M. F., RIBADEU-DUMAS, B., MERCIER, J. C. y GROSCLAUDE, F. (1990) Two of the three genetic variants of goat α_{S1} -casein wich are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. *Eur. J. Biochem.* **193**, 237-241.
- BROWN, J. R. (1975) Structure of bovine serum albumin. *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **34**, 591-597.
- BRULE, G. y LENOIR, J. (1990) La coagulación de la leche. En *El Queso*. A. Eck (ed.), Ediciones Omega, Barcelona. pp: 3-20.
- BINGHAM, E. (1979) Role of mammary casein kinase in the phosphorylation of milk proteins. *J. Dairy Res.* **46**, 181-185.
- BURNETTE, W. N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from

- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- BUTLER, J. E. (1974) Immunoglobulins of the mammary secretions. En *Lactation: A Comprehensive Treatise*, Vol. II. B. L. Larson y V. R. Smith (eds.), Academic Press, Nueva York. pp: 217-245.
- CALVO, M., AMIGO, L., OLANO, A., MARTIN, P. J. y RAMOS, M. (1989) Effect of thermal treatments on the determination of bovine milk added to ovine or caprine milk. *Food Chem.* **32**, 99-108.
- CALVO, M., LEAVER, J., LAW, A. J. R. y BANKS, J. M. (1992a) Analysis of caseins in cheese using ion-exchange chromatography. *Milchwiss.* **47**, 417-419.
- CALVO, M., LEAVER, J., LAW, A. J. R. y BANKS, J. M. (1992b) Changes in casein levels during the ripening of cheddar type cheese made from overheated milk. *Milchwiss.* **47**, 516-518.
- CARRETERO, C., MOR-MUR, M., PLA, R. y GUAMIS, B. (1992) SDS-PAGE study of pH 4.6 soluble proteins during ripening of goat milk cheese. *Milchwiss.* **4**, 292-295.
- CAYOT, P., COURTHADDON, J. L. y LORIENT, D. (1992) Purification of α_s -, β - and κ -caseins by batchwise ion-exchange separation. *J. Dairy Res.* **59**, 551-556.
- CHAPLIN, L. C. (1986) Hydrophobic interaction fast protein liquid chromatography of milks proteins. *J. Chromatogr.* **363**, 329-335.
- CLARK, R. B. y ENGVALL, E. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. En *Enzyme Immunoassays*. E. T. Maggio (ed.), Cleveland, CRC Press. pp: 161-179.
- COLLIN, J. C., KOKELAAR, A., ROLLET-REPECAUD, O. y DELACROIX-BUCHET A. (1991) Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC) : Comparaison des résultats. *Lait* **71**, 339-350.

- CREAMER, L. K. (1974) Preparation of α_{S1} -casein A. *J. Dairy Sci.* **57**, 341-344
- CREAMER, L. K. y RICHARDSON, B. C. (1974) Identification of the primary degradation product of α_{S1} -casein in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **9**, 9-13.
- CREAMER, L. K., RICHARDSON, T. y PARRY, D. A. D. (1981) Secondary structure of bovine α_{S1} and β -casein in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **211**, 689-696.
- CREAMER, L. K., ZOERB, H. F., OLSON, N. F. y RICHARDSON, T. (1982) Surface hydrophobicity of α_{S1} -I, α_{S1} -casein A and B and its implication in cheese structure. *J. Dairy Sci.* **65**, 902-906.
- DALGLEISH, D. G. y PARKER, T. G. (1980) Binding of calcium ions to bovine α_{S1} -casein and precipitability of the protein-calcium ion complexes. *J. Dairy Res.* **47**, 113-122.
- DALGLEISH, D. G. (1985) Glycosylated κ -caseins and the sizes of bovine casein micelles. Analysis of the different forms of κ -casein. *Biochem. Biophys. Acta* **830**, 213-215.
- DALGLEISH, D. G. (1987) The enzymatic coagulation of milk. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 1-63.
- DALGLEISH, D. G., HORNE, D. S. y LAW, A. J. R. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* **991**, 383-387.
- DALL'OLIO, S., DAVOLI, R. y TECLOSCHI, M. (1988) A contribution to the study of goat casein by chromatography. *Sci. Tec. Latt. Casearia* **39**, 167-178.
- DALL'OLIO, S., DAVOLI, R., RUSSO, V. (1989) Una nuova variante di β -caseina caprina. *Sci. Tec. Latt. Casearia* **40**, 24-28.
- DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. (1977) An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.* **44**,

213-221.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. (1987) Quantitative fractionation of casein mixtures by fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Res.* **54**, 369-376.

DESMAZEAUD, M. J., GRIPON, J. C., LE BARS, D. y BERGERE, J. L. (1976) Etude du role des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes. *Lait* **56**, 379-385.

DESMAZEAUD, M. J. y ZEVACO, C. (1979) Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwiss.* **34**, 606-611.

Diario de las Comunidades Europeas nº 174 de 20 de Marzo de 1992. pp: 23-32.

DI LUCCIA, A., MAURIELLO, R. y ADDEO, F. (1986) Identification of caprine casein variants by electrophoretic techniques. *Protides Biol. Fluids* **34**, 903-905.

DI LUCCIA, A., MAURIELLO, R., CHIANESE, L., MOIO, L. y ADDEO, F. (1990) κ -Casein polymorphism in caprine milk. *Sci. Tec. Latt. Casearia* **41**, 305-314.

DI STASIO, L. y MERLIN, P. (1979) A new κ -casein variant in cattle. *Proc. XVIth I International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism*, Leningrado II, 97-100.

DOSAKA, S., KAMINOGAWA, S., TANEYA, S. y YAMAUCHI, K. (1980) Hydrophobic surface areas and net charge of α_{S1} , κ -casein, and α_{S1} -casein: κ -casein complex. *J. Dairy Res.* **47**, 123-129.

DURAND, M., MEUSNIER, M., DELAHAYE, J. y PRUNET, P. (1974) Detection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la methode de l'immunodifusion en gelosa. *Boll. Ac. Vet.* **47**, 247-258.

EBNER, K. E. y BRODBECK, U. (1968) Biological role of α -lactalbumin: a review. *J. Dairy Sci.* **51**, 317-322.

EIGEL, W. N. (1977) Formation of γ_1 -A², γ_2 -A² and γ_3 -A caseins by in vitro proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin. *Int. J. Biochem.* **8**, 187-192.

- EIGEL, W. N., HOFMANN, C. J., CHIBBER, B. A. K., TOMICH, J. M., KEENAN, T. W. y MERTZ, E. F. (1979) Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2244-2248.
- EIGEL, W. N. (1981) Identification of protease-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine β -casein. *Int. J. Biochem.* **13**, 1081-1086.
- EIGEL, W. N., BUTLER, J. E., ERNSTROM, C. A., FARREL, H. M., Jr., HARWALKAR, V. R., JENESS, R. y WHITNEY, R. McL. (1984) Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* **67**, 1599-1631.
- ELBERTZHAGEN, H. y WENZEL, E. (1982) Detection of bovine milk in sheep milk cheese by means of immunoelectrophoresis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 15-16.
- ELBERTZHAGEN, H. y WENZEL, E. (1987) Detection of bovine, sheep's and goat's milk cheese by immunoelectrophoresis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **185**, 357-361.
- EL-NEGOUMY, A. M. (1973) Separation of lambda casein and some of its properties. *J. Dairy Sci.* **56**, 1486-1491.
- EL-NEGOUMY, A. M. (1976) Two rapid and improved techniques for chromatographic fractionation of casein. *J. Dairy Sci.* **59**, 153-156.
- ENGVAL, E. y PERLMANN, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitation assay to immunoglobulin G. *Immunochem.* **8**, 871-879.
- ERHARDT, G. (1989) κ -caseins in bovine milk. Evidence of a further allele (κ -CnE) in different breeds. *J. Anim. Breed Genet.* **106**, 225-231.
- FAHMI, A. H., SIRRY, W. G. y SAFWAT, A. (1956) The size of fat globules and the creaming power of cow, buffalo, sheep and goat milk. *Int. J. Dairy Sci.* **9**, 124-130.
- FARRELL, H. M., Jr., KUMOSINSKI, T. F., PULASKI, P. y THOMPSON, M. P. (1988) Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 146-152.
- FENG, Z.-K. y CUNNINGHAM-RUNDLES, C. (1989) Production of a monoclonal

- antibody to bovine κ -casein. *Hybridoma* **8**, 223-230.
- FERRETI, L., LEONE, P., SGARAMELLA, V. (1990) Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6829-6833.
- FOX, P. F. y GUINEY, J. (1972) A procedure for the partial fractionation of the α_s -casein complex. *J. Dairy Res.* **39**, 49-53.
- FOX, P. F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* **72**, 1379-1400.
- FRUTOS, M. DE, CIFUENTES, L., DIEZ MASA, J. C., AMIGO, L. y RAMOS, M. (1991) Application of HPLC for the detection of proteins in whey mixtures from different animal species. *HRC & CC* **14**, 289-291.
- GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1989) Development of a cow's milk identification test (COMIT) for field use. *J. Dairy Res.* **56**, 691-698.
- GARCIA, T. (1990) Identificación de mezclas de leche de vaca, oveja y cabra mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), utilizando anticuerpos policlonales frente a proteínas del suero de leche. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., MORALES, P., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1990) Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Sci.* **73**, 1489-1493.
- GARCIA, T. MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., AZCONA, J. I., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1991) Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Food Prot.* **54**, 366-369.
- GARCIA, T., MARTIN, R., MORALES, P., GONZALEZ, I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1993) Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk. *Milchwiss.* **48**, 563-566.
- GARCIA, T., MARTIN, R., MORALES, P., GONZALEZ, I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1994) Detection of goat's milk in ewe's milk by an indirect

- ELISA. *Food Agric. Immunol.* **6**, 113-118.
- GATUSO, A. M. y FAZIO, G. (1980) Characteristics and composition of milk fat from of Sicilian breeds. *Riv. Ital. Sos. Grasse* **57**, 530-535.
- GAYE, P., GAUTRON, J. P., MERCIER, J. C. y HAZE, G. (1977) Amino terminal sequences of the precursors of ovine caseins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **79**, 903-911.
- GAZZAZ, S. S., RASCO, B. A., DONG, F. M. (1992) Aplication of immunochemical assays to food analysis. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**, 197-229.
- GODING, J. W. (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practise*. B. J. Harcourt (ed.), Academic Press, Londres.
- GOMBOCZ, E., HELLWIG, E. y PETUELY, F. (1981a) Immunological estimation of bovine casein in sheep cheese products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **172**, 178-181.
- GOMBOCZ, E., HELLWIG, E. y PETUELY, F. (1981b) Quantitative determination of proteins in food by immunoturbidimetry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 15-16.
- GONZALEZ LLANO, D., POLO, C. y RAMOS, M. (1990) Update on HPLC and FPLC analysis of nitrogen compounds in dairy products. *Lait* **70**, 255-277.
- GORDON, W. G., GROVES, M. L. y BASCH, J. J. (1963) Bovine milk "red protein": Amino acid composition and comparison with blood transferrin. *Biochem.* **2**, 817-820.
- GORDON, W. G., GROVES, M. L., GREENBERG, R., JONES, S. B., KALAN, E. B., PETERSON, R. F. y TOWNEND, R. E. (1972) Probable identification of γ -, TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.* **55**, 261-263.
- GRAPPIN, R., RANK, T. C. y OLSON, N. F. (1985) Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *J. Dairy Sci.* **68**, 531-540.
- GREEN, M. L. y FOSTER P. M. D. (1974) Comparison of the rates of protolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *J. Dairy Res.* **41**, 269-282.

- GROENEN, M. A. M., DIJKHOF, R. J. M., VERSTEGE, A. J. M. y VAN DER POEL, J. J. (1993) The complete sequence of the gene encoding bovine α_{s2} -casein. *Gene* **123**, 187-193.
- GROSCLAUDE, F., GARNIER, J. y RIBADEAU DUMAS, B. (1964) Etroite dépendance des loci controlant le polymorphisme des caséines α et β . *C. R. Hebd. Acad. Sci. Paris* **259**, 1569-1571.
- GROSCLAUDE, F., PUJOLLE, J., GARNIER, J. y RIBADEAU DUMAS, B. (1965) Déterminisme génétique des caséines κ du lait du vache; étroite liaison du locus κ -Cn avec les loci α_{s1} -Cn y β -Cn. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris* **261**, 5229-5232.
- GROSCLAUDE, F., PUJOLLE, J., GARNIER, J. y RIBADEAU DUMAS, B. (1966) Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait du vache : α_{s1} -Cn D y β -Lg D. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris* **261**, 5229-5232.
- GROSCLAUDE, F., MERCIER, J. C. y RIBADEAU DUMAS, B. (1969) Sur la localization, dans la séquence COOH-terminale de la caséine α_{s1} bovine, de la substitution Glu/Gly différenciant les variants génétiques B et C. *C. R. Acad. Sci. Paris* **268**, 3133-3136.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M. F., MERCIER, J. C. y RIBADEAU DUMAS, B. (1970) Localisation dans la partie NH_2 terminale de la caséine α_{s1} bovine d'une délétion de 13 acides aminés différenciant le variant A des variants B et C. *FEBS Lett.* **11**, 109-112.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M. F., MERCIER, J. C. y RIBADEAU DUMAS, B. (1972) Characterization of the genetic variants of bovine α_{s1} - and β -casein. *Eur. J. Biochem.* **26**, 328-337.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M. F., MERCIER, J. C. y RIBADEAU DUMAS, B. (1973) Primary structure of α_{s1} -casein and β -casein. Correction. *Eur. J. Biochem.* **40**, 323-324.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M.F. y MERCIER, J. C. (1974) Comparison of the genetic polymorphism of the milk proteins of zebu and bovines. *Ann. Génét. Sél. Anim.* **6**,

305-329.

- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M.F., MERCIER, J. C., BONNEMARIE, J. y TESSIER, J. H. (1976) Polymorphism of the milk proteins of Nepalese bovines I. The yak and biochemical characterization of two new variants: β -lactoglobulin D and α_{s1} -casein E. *Ann. Génét. Sél. Anim.* **8**, 461-479.
- GROSCLAUDE, F., JOUDRIER, P. y MAHÉ, M. F. (1978) Polymorphisme de la caséine α_{s2} bovine: étroite liaison du locus α_{s2} -Cn avec les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn; mise en évidence d'une délétion dans le variant α_{s2} -Cn D. *Ann. Génét. Sél. Anim.* **10**, 313-327.
- GROSCLAUDE, F., JOUDRIER, P. y MAHÉ, M.F. (1979) A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine α_{s2} -casein. *J. Dairy Res.* **46**, 211-213.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M.F., BRIGNON, G., DI STASIO, L. y JEUNET, R. (1987) A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. *Génét. Sél. Evol.* **19**, 399-412.
- GROSCLAUDE, F. (1988) Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères de lait. *INRA Prod. Anim.* **1**, 5-17.
- GROVES, M. L., McMEEKIN, T. L., HIPPEL, N. J. y GORDON, W. G. (1962) Preparation of β - and γ -casein by column chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* **57**, 197-203.
- GROVES, M. L. y GORDON, W. G. (1969) Evidence from amino acid analysis for a relationship in the biosynthesis of γ - and β -caseins. *Biochem. Biophys. Acta* **194**, 421-432.
- GUILLOU, H., MIRANDA, G. y PELISSIER, J. P. (1987) Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC). *Lait* **67**, 135-148.
- GUIDRY, A. J., BUTLER, J. E., PEARSON, R. E. y WEINDLAND, B. T. (1980) IgA,

- IgG₁, IgG₂, IgM, and BSA in serum mammary secretions throughout lactation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1**, 329-341.
- HAASNOT, W., VENEMA, D. P. y ELENBASS, H. L. (1986) Determination of cow milk in the milk and cheese of ewes and goats by fast protein liquid chromatography. *Milchwiss.* **41**, 642-645.
- HAASNOT, W., VENEMA, D. P. y ELENBASS, H. L. (1987) A preliminary study to determine the extent of proteolysis in Gouda cheese using fast protein liquid chromatography on various stationary phases. En *Rapid Analysis in Food Processing and Food Control* (Proceedings of Fourth European Conference on Food Chemistry) 1-4 June, Loen, Noruega **1**, 71-76.
- HANSON, L. A., SAMMUELSON, E. G. y HALMGREN, J. (1967) Detection of ceruloplasmin in bovine milk and blood serum. *J. Dairy Res.* **37**, 493-504.
- HARLOW, E. y LANE, D. (1988) En *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. Nueva York.
- HAYES, H. y PETIT, E. (1993) Mapping of the β -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homologous cattle, sheep and goat chromosomes. *Mamm. Genome* **4**, 207-210.
- HAYES, H., PETIT, E., BOUNIOL, C. y POPESCU, P. (1993a) Localization of the α_{S2} gene (CASAS2) to the homoeologous cattle, sheep and goat cromosomes 4 by in situ hybridation. *Cytogenet. Cell Genet.* **64**, 281-285.
- HAYES, H., POPESCU, P. y DUTRILLAUX, B. (1993b) Comparative gene mapping of lactoperoxidase retinoblastoma, and α -lactoalbumin genes in cattle, sheep and goats. *Mamm. Genome* **4**, 402-406.
- HEFLE, S. L. (1995) Immunoassay applications to food analysis. *Food Technol.* **2**, 102-107.
- HEPPELL, L. M. J., CANT, A. J. y KILSHAW, P. J. (1984) Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment; a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *Br. J. Nutr.* **51**, 29-36.

- HEPPELL, L. M. J. (1985) Determination of milk protein denaturation by an enzyme-linked immunosorbent assay. En *Immunoassays in Food Analysis*. B. A. Morris y M. N. Clifford (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres-Nueva York. pp: 115-121.
- HERRERO ALAMO, L. (1992) Los quesos españoles y sus posibilidades de exportación a la C.E.E. *Rev. Esp. Lechería*. **40**, 17-23.
- HERSKOVITS, T. T. (1966) On the conformation of caseins. Optical rotatory properties. *Biochem*. **5**, 1018-1026.
- HILL, R. D., LAHAV, E. y GIVOL, D. (1974) A rennin-sensitive bond in α_{S1} and β -casein. *J. Dairy Res.* **41**, 147-152.
- HIPP, N. J., GROVES, M. L., CUSTER, J. H. y McMEEKIN, T. L. (1952) Separation of α -, β - and γ -casein. *J. Dairy Sci.* **35**, 272-281.
- HOAGLAND, P. D., THOMPSON, M. P. y KALAN, E. B. (1971) Amino acid composition of α_{S3} -, α_{S4} -, α_{S5} -caseins. *J. Dairy Sci.* **54**, 1103-1110.
- HOLLAR, C. M., LAW, A. J. R., DALGLEISH, D. G. y BROWN R. J. (1991) Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.* **74**, 3308-3313.
- HOLT, C. y HUKINS, D. W. L. (1991) Structural analysis of the environment of calcium ions in crystalline and amorphous calcium phosphates by X-ray absorption spectroscopy and a hypothesis concerning the biological function of the casein micelle. *Int. Dairy J.* **1**, 151-158.
- HUMPHREY, R. S. y NEWSOME, L. J. (1984) High-performance ion-exchange chromatography of the major bovine milk proteins. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **19**, 197-204.
- IGARASHI, Y. y SAITO, Z. (1970) Some properties of temperature-sensitive casein in cows' milk. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **41**, 262-269.

- IRLAM, J. C., HOLT, C., HASNAIN, S. S. y HUKINS, D. W. L. (1985) Comparison of the structure of micellar calcium phosphate in milk from six species by extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *J. Dairy Res.* **52**, 267-273.
- ISCNDA, 1989 (1990) International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. D. Di Bernardino, H. Hayes, R. Fries y S. Long (eds.). *Cytogenet. Cell. Genet.* **53**, 65-79.
- IVERSON, J. L. y SHEPPARD, A. J. (1989) Detection of adulteration in cow, goat and sheep milk utilizing gas liquid chromatographic fatty acid data. *J. Dairy Sci.* **72**, 1707-1712.
- JAUBERT, A. y MARTIN, P. (1992) Reverse phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{S1} and α_{S2} genetic variants. *Lait* **72**, 235-247.
- JENNES, R. (1980) Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* **63**, 1605-1629.
- JENNES, R. (1982) Interspecies comparison of milk proteins. En *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. I: Proteins. P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science, Londres. pp. 87-114.
- JENNES, R. (1988) Composition of milk. En *Fundamentals of Dairy Chemistry*. N. P. Wong (ed.), Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York. pp.1-38.
- KAISER, K. P. y KRAUSE, I. (1985) Analysis of proteins in foods by means of electrophoretic and chromatographic methods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**, 181-201.
- KAMINARIDES, S. E. y ANIFANTAKIS, E. M. (1993) Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using FPLC. *J. Dairy Res.* **60**, 495-504.
- KAMINOOGAWA, S., YAMAUCHI, K., MIYAZAWA, S. y KOYA, Y. (1980) Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *J. Dairy Sci.* **63**, 701-709.

- KATO, A. y NAKAI, S. (1980) Hidrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **624**, 13-20.
- KEARNEY, J. F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B. y RAJEWSKY, K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has IgM immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548-1550.
- KIDDY, C. A. (1975) Gel electrophoresis in vertical polyacrilamide beds. Procedure I and II. En *Methods of Gel Electrophoresis of Milk Proteins*. H. E. Swaisgood, B. L. Larson, E. B. Kalan, J. L. Brunner, C. V. Morr, P. M. T. Hansen (eds.), American Dairy Science Association, Champaign, Ill. pp: 14-32.
- KIM, Y. K., YAGUCHI, M. y ROSE, D. (1969) Isolation and amino-acid composition of para-kappa-casein. *J. Dairy Sci.* **52**, 316-320.
- KING, N. (1955) The milk fat globule membrane. *Technical Communication No. 2*. Commonwealth Bureau of Dairy Science, Commonwealth Agriculture Bureau, Farnham Royal, Bucks, England.
- KISHLAW, P. J., HEPPELL, L. M. J. y FORD, J. E. (1982) Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch. Dis. Child.* **57**, 842-847.
- KOBAYASHI, T., AMETANI, A., YAMAUCHI, K. y KAMINOGAWA, S. (1991) Differences in defining residues relevant to antibody binding by ELISA and proteolysis protection at the level of peptide antigenic determinants. *Biochem. Biophys. Acta* **1077**, 11-18.
- KOCZAN, D., HOBOM, G. y SEYFERT, H. M. (1991) Genomic organization of the bovine α_{s1} -casein gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5591-5596.
- KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- KOPFLER, F. C., PETERSON, R. F. y KIDDY, C. A. (1969) Amino acid composition of chromatographically separated β -casein. *J. Dairy Sci.* **52**, 1573-1576.

- KRAUSE, I. y BELITZ, D. Z. (1985) Differenzierung von Milchproteinen verschiedener Tierarten: Nachweis von Kuhmilch in Säure, Ziegen, Büffelmilch bzw. Käse. *Lebensm. Chemie Gerichte*. **39**, 33-36.
- KRAUSE, I., ELBERTZHAGEN, H., BERNER, I. y KLOSTERMEYER, H. (1988) Isoelectric focusing and crossed-immuno-electrophoresis: two supplementary methods for fast and reliable detection of cow's milk present in ewe's or goat's milk and cheese. *Fre. Zeits. Anal. Chem.* **330**, 466-467.
- KUMOSINSKI, T. F., BROWN, E. M. y FARRELL, H. M., Jr. (1991a) Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: κ -casein. *J. Dairy Sci.* **74**, 2879-2887.
- KUMOSINSKI, T. F., BROWN, E. M. y FARRELL, H. M., Jr. (1991b) Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: α_{s1} -casein. *J. Dairy Sci.* **74**, 2889-2895.
- KUZDZAL-SAVOIE, S. y KUZDZAL, W. (1970) Application à l'étude des acides gras mineurs gas chromatographie en phase gazeuse à quelques problèmes de contrôle. *Tech. lait.* **680**, 13-19.
- KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J.W. y BEATTIE, C. W. (1990a) Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.* **73**, 2741-2748.
- KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J.W. y BEATTIE, C. W. (1990b) Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine α -lactoalbumin. *J. Dairy Sci.* **73**, 3077-3083.
- KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J.W. y BEATTIE, C. W. (1991) Isolation and characterization of monoclonal antibodies monospecific for bovine α -casein and β -casein. *J. Dairy Sci.* **74**, 803-810.
- LASCELLES, A. K. (1977) Role of the mammary gland and milk immunology. *Symp. Zool. Soc. London* **41**, 241-260.
- LASKOWSKI, M., Jr. y LASKOWSKI, M. (1950) Trypsin inhibitor in colostrum. *Fed. Proc.* **9**, 194.

- LASKOWSKI, M., Jr. y LASKOWSKI, M. (1951) Crystalline trypsin inhibitor from colostrum. *J. Biol. Chem.* **190**, 563-573.
- LARSEN, B. y THYMANN, M. (1966) Studies on milk protein polymorphism in Danish cattle and the interaction of the controlling genes. *Acta Vet. Scand.* **7**, 189-205.
- LAW, B. A. (1984) Flavour Development in Cheeses. En *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. F. L. Davies y B. A. Law (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres-Nueva York. pp: 187-208.
- LAW, B. A. (1987) Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En *Cheese: Chemistry, Phisic and Microbiology*. P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres-Nueva York. pp: 1-365.
- LAU, K.Y., BARBANO, D. M. y RASMUSSEN, R. R. (1991) Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in cheddar cheese during aging. *J. Dairy Sci.* **74**, 727-740.
- LAW, A. J. R. y TZIBOULA, A. (1992) Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange FPLC. *Milchwiss.* **47**, 558-561.
- LAW, A. J. R., PAPOFF, C. M., DALGLEISH, D. G. y CAMPUS, R. L. (1992) Quantitative fractionation of ovine caseins by cation-exchange FPLC. *Milchwiss.* **47**, 279-282.
- LAW, A. J. R., HORNE, D. S., BANKS, J. M. y LEAVER, J. (1994) Heat induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwiss.* **49**, 125-129.
- LAXMINARAYANA, H. y DASTUR, N. M. (1968) Buffaloes milk and milk products. *Dairy Sci. Abstr.* **30**, 177-231.
- LEACH, B. E., BLALOCK, C. R. Y. y PALLANSCH, M. J. (1967) Kinin-like activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **50**, 763-764.
- LEAVER, J. y LAW, A. J. R. (1992) Preparative scale purification of bovine caseins on a cation-exchange resins. *J. Dairy Res.* **59**, 557-561.

- LEGER, D., VERBERT, A., LOUCHEAUX, M. H. y SPIK, G. (1977) Study of the molecular weight of human lactotransferrin and serotransferrin. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **17**, 737-747.
- LEUNG, C. T., KUZMANOFF, K. M. y BEATTIE, C. W. (1991) Isolation and characterization of monoclonal antibody directed against bovine α_{s2} -casein. *J. Dairy Sci.* **74**, 2872-2878.
- LEVIEUX, D. (1977) New technique for detecting adulteration of goat's and ewe's milk. *Dossiers de l'Elevage* **2**, 37-46.
- LEVIEUX, D. (1980) The development of a rapid and sensitive methods based on hemagglutination inhibition, for the measurement of cow milk goat milk. *Ann. Rech.* **11**, 151-126.
- LEVIEUX, D. y VENIEN, A. (1994) Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cow's milk in goat's milk or ewe's milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.* **61**, 91-99.
- LITTLEFIELD, J. W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145**, 709-710.
- LOPEZ FANDIÑO, R. (1992) Proteolisis de las Caseínas y su Incidencia en la Tecnología de Productos Lácteos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- LOTITO, A. y CUCURACHI, A. (1967) I grasso del latte di pecora all'esame gas-chromatografico. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **44**, 341-348.
- LOUCHEAUX-LEFEBVRE, M. H., AUBERT, J. R. y JOLLES, P. (1978) Prediction of the conformation of the cow and sheep κ -caseins. *Biophys. J.* **23**, 323-326.
- LOUKAS, S., VAROCHA, D., ZIOUDROU, C., STREATY, R. A. y KLEE, W. A. (1983) Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochem.* **22**, 4567-4571.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951) Protein mesurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

- LUQUET, F. M. (1991) En *Leche y Productos Lácteos. Vaca-Oveja-Cabra*. Vol. 1. Acribia S. A., Zaragoza, España.
- MACDONALD, C. A. y THOMAS, M. A. W. (1970) The rennin sensitive bond of bovine κ -casein. *Biochem. Biophys. Acta* **207**, 139-143.
- MACKINLAY, A. G. y WAKE, R. G. (1965) Fractionation of S-carboxymethyl- κ -casein and characterization of the components. *Biochem. Biophys. Acta* **104**, 167-180.
- MACKINLAY, A. G. y WAKE, R. G. (1971) κ -Casein and its attack by rennin (chymosin). En *Milk Proteins*, Vol. II. H. A. McKenzie (ed.), Academic Press, Nueva York. pp:150-173.
- MAHÉ, M. F. y GROSCLAUDE, F. (1989) α_{S1} -Cn D, another allele associated with a decreased synthesis rate at the caprine α_{S1} -casein locus. *Génét. Sél. Evol.* **21**, 127-129.
- MAHÉ, M. F. y GROSCLAUDE, F. (1993) Polymorphism of β -casein in the creole goat of Guadeloupe: evidence for a null allele. *Génét. Sél. Evol.* **25**, 403-408.
- MAHIEU, H., LUQUET, F. M. y MOUILLET, L. (1976) Mineral and urea contents of bulk mixed milk and milk from individual producers. *Lait* **56**, 657-698.
- MAHIEU, H., LE JAOUEN, J. C., LUQUET, F. M. y MOUILLET, L. (1977) Etude comparative de la composition et de la contamination des laits des espèces laitières bovines, ovines et caprines. *Lait* **57**, 561-571.
- MAHMOUD, M. I., MALONE, W. T. y CORDLE, C. T. (1992) Enzymatic hidrolisis of casein: effect of degree of hidrolisis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* **57**, 1223-1229
- MARKWELL, M. A. K., HASS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **81**, 206-210.
- MARTIN, P. (1993) Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. *Lait* **73**, 511-532.

- MATHESON, A. R. (1981) The immunological determination of chymosin activity in cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **16**, 33-41.
- MATOKA, T., HAYASHI, R. y HATA, T. (1970) Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolysate of casein and their chemical structure. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 1235-1242.
- MAY, C. D., FOMON, S. J. y REMIGIO, L. (1982) Immunologic consequences on feeding infants with cow milk and soy products. *Acta Paediatr. Scand.* **71**, 43-51.
- McKENZIE, H. A. y WAKE, R. G. (1961) An improved method for the isolation of kappa-casein. *Biochem. Biophys. Acta* **47**, 240-242.
- McKENZIE, H. A. (1971). En *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology*. H. A. McKenzie (ed.). Vol. II. Academic Press, Nueva York. pp: 258-266.
- MEISEL, H. (1986) Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* **196**, 223-227.
- MERCIER, J. C., MAUBOIS, J. L., POZNANSKI, S. y RIBADEAU DUMAS, B. (1968) Fractionnement préparatif des caseines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **50**, 521-530.
- MERCIER, J. C., GROSCLAUDE, F. y RIBADEAU DUMAS, B. (1971) Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. *Eur J. Biochem.* **23**, 41-51.
- MERCIER, J. C., ADDEO, F. y PELISSIER, J. P. (1976) Structure primaire du caseinomacropéptide de la caséine κ -caprine. *Biochimie* **58**, 1303-1310.
- MERCIER, J. C. y GAYE, P. (1980) Study of secretory lactoproteins: primary structures of the signals and enzymatic processing. *Ann. NY. Acad. Sci.* **343**, 232-251.
- MERCIER, J. C. (1981) Phosphorylation of caseins. Present evidence for an amino acid triplet code post-translationally recognized by specific kinases. *Biochimie* **63**, 1-17.
- MERCIER, J. C., GROSCLAUDE, F. y MARTIN, P. (1991) La caséine κ et la famille multigénique des trois caséines "sensibles au calcium". Polymorphisme, biosynthèse et

évolution. *Med. Sci.* 3 7, 1-8.

MERCIER, J. C. y GROSCLAUDE, F. (1992) Génétique moléculaire des protéines du lait et des leurs gènes. En *Aspects Modernes de la Biologie de la Lactation*. INSERM-INRA.

MERCIER, J. C. y VILLOTE, J. L. (1993) Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3097.

MIKKELSEN, J., HOJRUP, P. y KNUDSEN, J. (1987) Purification of goat's milk casein by reversed-phase high performance liquid chromatography and identification of α_{S1} -casein. *J. Dairy Res.* 54, 361-367.

MINAMIURA, N., MATSUMURA, Y. , FUKUMOTO, J. y YAMAMOTO, Y. (1972) Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinase. *Agric. Biol. Chem.* 36, 588-596.

MIRANDA, G., ANGLADE, P., MAHÉ, M. F. y ERHARDT, G. (1993) Biochemical characterization of the bovine genetic κ -casein C and E variants. *Anim. Genet.* 24, 27-31.

MOHRAND-FEHR, P. y FLAMANT, J. C. (1983) Caracteristiques des laits de brevis et de chèvres. "E. A. A. P. Int. Symposium on Production of Sheep and Gat in the Mediterranean Area". Ankara, Turquía. 384.

MOIO, L., SASSO, M. L., CHIANESE, L. y ADDEO, F. (1990) Rapid detection of bovine milk in ovine, caprine and water buffalo milk or cheese by gel isoelectric focusing on Phast System. *Ital. J. Food Sci.* 3, 185-190.

MOIO, L., CHIANESE, L., RIVEMALE, M. y ADDEO, F. (1992) Fast detection of bovine milk in roquefort cheese with PhastSystem by gel isoelectric focusing and immunoblotting. *Lait* 72, 87-93.

MONACO, H. L., ZANOTTI, G., SPADON, P., BOLOGNESI, B., SAWYER, L. y ELIOPOULOS E. E. (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 197, 695-706.

- NAGAUNE, S., KAMINOGAWA, S., ENOMOTO, A., KOBAYASHI, T., KURISAKI, J. y YAMAUCHI, K. (1988) Preparation of anti-bovine β -casein fragment. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2577-2581.
- NG-KWAI-HANG, K. F. y PELISSIER, J. P. (1989) Rapid separation of bovine caseins by mass ion exchange chromatography. *J. Dairy Res.* **56**, 391-397.
- NG-KWAI-HANG, K. F. y GROSCLAUDE, F. (1992) Genetic polymorphism of milk proteins. En *Advanced Dairy Chemistry*. P. F. Fox (ed.), Elsevier, Essex. pp. 405-455.
- NUÑEZ, M., MEDINA, M. y GAYA, P. (1989) Ewe's milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *J. Dairy Res.* **56**, 303-321.
- ONO, T., KOHNO, H., ODAGIRI, S. y TAKAGI, T. (1989) Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. *J. Dairy Res.* **6**, 61-68.
- ORTIN, L., SANCHEZ ALGABA, T., DOMINGUEZ, M. C. y ORTIN, F. J. (1992a) Quesos frescos y maduros: determinación de mezclas de leche de cabra, vaca y oveja, por isoelectroenfoque sobre gel de poliacrilamida, capa muy fina (Phast System). Proteínas séricas en el queso. *Alimentaria* **231**, 39-42.
- ORTIN, L., SANCHEZ ALGABA, T., DOMINGUEZ, M. C. y ORTIN, F. J. (1992b) Determinación de las proteínas lácteas en los quesos de mezcla de oveja, cabra y vaca. Empleo del Phast-System en la separación de las κ -caseínas y cuantificación por densitometría. *Alimentaria* **234**, 27-33.
- OTANI, H., TAKAYAMA, K. y TOKITA, F. (1986) Studies on the antigenicity of bovine α_{S1} -casein: Antigenic activities of some peptides derived from the C-terminal region. *Milchwiss.* **41**, 565-568.
- OTANI, H., MINE, Y. y HOSONO, A. (1988) Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. VI. Antigenic activities of peptides produced by triptic and V8-proteolytic digestions of peptide 110-144. *Milchwiss.* **43**, 759-761.
- OTANI, H., DONG, X. Y. y HOSONO, A. (1990) Preparation of low-immunogenic peptide fragments from cow milk casein. *Milchwiss.* **45**, 217-220.

- OTANI, H., NEGORO, H. y HOSONO, A. (1991) Studies of the antigenicity of cow κ -casein. *Milchwiss.* **46**, 23-26.
- OUDSHOORN P., HIEMSTRA, P. y HESSING, M. (1994) Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine β -casein. *Int. Dairy J.* **4**, 671-678.
- PALO, V. (1975) Falsification prove of sheep's cheese by cow's cheese. *Int. Dairy Fed.* A-7-DOC 3.
- PAPIZ, M. Z., SAWYER, L., ELIOPOULOS, E. E., NORT, A. C. T., FINDLAY, J. B. C., SIVAPRASADARAO, R., JONES, T. A., NEWCORNER, M. E. y KRAULIS, P. J. (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* **324**, 383-385.
- PARKASH, S. y JENESS, R. (1968) The composition and characterization of goat's milk. A Review. *Dairy Sci. Abstracts* **30**, 67-87.
- PEARCE, R. J. y ZADOW, J. G. (1978) Isoelectric focusing of milk proteins. *XXth International Dairy Congress (Australia)*, Vol. E, 217-218.
- PEREZ, M. D., SANCHEZ, L., ARANDA, P., ENA, J. M. y CALVO, M. (1992) Use of an immunoassay method to detect adulteration of ewe's milk. En *Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay Systems*. M. R. A. Morgan, C. J. Smith y P. A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres-Nueva York. pp: 41-48.
- PETERSON, R. F. y KOPFLER, F. C. (1966) Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 388-392.
- PIERRE, A. y PORTMANN, A. (1970) Emploi de l'electrophorèse en gel de polyacrylamide pour mettre en evidence et doser le lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas de fromages. *Ann. Technol. Agric.* **19**, 107-130.
- PINTO, F. C. (1966) Serological differentiation of cow's, buffalo's, goat's and sheep's milks. *J. Dairy Res.* **33**, 129-137.

- POLIS, B. D., SHMUCKLER, H. W. y CUSTER, J. H. (1950) Isolation of a crystalline albumin for milk. *J. Biol. Chem.* **187**, 349-354.
- POLZHOFFER, K. P. (1972) Synthesis of a rennin-sensitive pentadecapeptide from cow κ -casein. *Tetrahedron* **28**, 855-865.
- PONTECORVO, G. (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. *Somat. Cell. Genet.* **1**, 397-400.
- POTTER, M. (1972) Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol. Rev.* **52**, 631-719.
- PRAGER, M. J. (1989) Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. *J. Off. Anal. Chemist.* **72**, 418-421.
- RADFORD, D. V., TCHAN, Y. T. y McPHILLIPS, J. (1981) Detection of cow's milk in goat's milk by immunoelectrophoresis. *Aust. J. Dairy Technol.* **36**, 114-146.
- RAMOS, M., MARTINEZ-CASTRO, I. y JUAREZ, M. (1977) Detection of cow's milk in manchego cheese. *J. Dairy Sci.* **60**, 870-877.
- RAMOS, M., MARTINEZ-CASTRO, I. y JUAREZ, M. (1980) Detección de leche de vaca en leche de cabra. Aplicación a quesos frescos. *III Congreso Nacional de Química. Química Agrícola Alimentaria*. Sevilla. 121-127.
- RAMOS, M. y JUAREZ, M. (1981) Criterios analíticos para la detección de leche de vaca en mezclas con leche de otras especies. *Rev. Esp. Lechería* **121**, 193-206.
- RAMOS, M. y JUAREZ, M. (1984) Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cow's, ewe's and goat's milk. *Bull. Int. Dairy Fed.* **181**, 3-9.
- RAMOS, M., SANCHEZ, R. M. y OLANO, A. (1985) Studies on quantitative determination of caseins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **9**, 24-27.
- RAMOS, M. y JUAREZ, M. (1986) Electrophoretic, chromatographic and immunological

- methods for detecting mixtures of milk from different species. *Bull. Int. Dairy Fed.* **202**, 175-187.
- RAMOS, M. y JUAREZ, M. (1989) Detección de mezclas de leche de distintas especies en la fabricación de quesos. Últimas tendencias. *Rev. Española de Lechería*. **1**, 56-63.
- RANK, T. C., GRAPPIN, R. y OLSON, N. F. (1985) Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review. *J. Dairy Sci.* **68**, 801-811.
- Real Decreto 2478/1966, de 6 de Octubre (B. O. E., 7/10/1966). Reglamento de Centrales Lecheras y otras Industrias Lácteas.
- Real Decreto 503/1986, de 21 de Febrero (B. O. E., 14/3/1986). Norma general de Calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior.
- Real Decreto 1933/1991, de 18 de Octubre (B.O.E., 30/10/1991). Métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.
- REED, R. G., PUTNAM, F. W. y PETERS, T., Jr. (1980) Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin. *Biochem. J.* **191**, 867-868.
- REIMERDES, E. H. y HERLITZ, E. (1979) The formation of γ -caseins during cooling of raw milk. *J. Dairy Res.* **46**, 219-225.
- REMEUF, F. y LENOIR, J. (1986) Relationship between the physico-chemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Bull. Int. Dairy Fed.* **202**, 68-72.
- REMEUF, F., LENOIR, J. y DUBY, C. (1989) Etude des relations entre las caracteristiques physicochimiques des laits de chèvre et leur aptitude á la coagulation par la présure. *Lait* **69**, 499-518.
- REVILLE, W. J. y FOX, P. F. (1978) Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **2**, 167-174.
- RIBADEAU DUMAS, B., MAUBOIS, J. L., MOCQUOT, G. y GARNIER, J. (1964) A study of casein by DEAE-cellulose column chromatography in urea. *Biochem. Biophys. Acta* **82**, 494-506.

- RIBADEAU DUMAS, B., BRIGNON, F., GROSCLAUDE, F. y MERCIER, J. C. (1972) Primary structure of bovine β -casein. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* **25**, 505-514.
- RIBADEAU DUMAS, B. (1981) Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Rev. Lait. Franç.* **400**, 17-32.
- RICHARDSON, B. C., CREAMER, L. K. y MUNFORD, R. E. (1973) Comparative micelle structure I. The isolation and chemical characterization of caprine κ -casein. *Biochem. Biophys. Acta* **310**, 111-117.
- RICHARDSON, B. C., CREAMER, L. K. y MUNFORD, R. E. (1974) Comparative micelle structure II. Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *J. Dairy Res.* **41**, 239-247.
- RICHARDSON, B. C. y CREAMER, L. K. (1974) Comparative micelle structure III. The isolation and chemical characterization of caprine β_1 -casein and β_2 -casein. *Biochem. Biophys. Acta* **365**, 133-137.
- RICHARDSON, B. C. y CREAMER, L. K. (1975) Comparative micelle structure IV. The similarity between caprine α_s -casein and bovine α_{s3} casein. *Biochem. Biophys. Acta* **393**, 37-47.
- RICHARDSON, B. C. y CREAMER, L. K. (1976) Comparative micelle structure V. The isolation and characterization of major caseins. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* **11**, 46-53.
- RICHARDSON, B. C., MERCIER, J. C. y RIBADEAU DUMAS, B. (1978) The primary structure of the ovine β -caseins. *Proc. XX Int. Dairy Congr. (Paris)* F: 221.
- RICHARDSON, B. C. y MERCIER, J. C. (1979) The primary structure of bovine β -caseins. *Eur. J. Biochem.* **99**, 285-297.
- RICHARDSON, B. C., y ELSTON, P. D. (1984) Plasmin activity in commercial caseins and caseinates. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **19**, 63-69.
- RISPOLI, S., RIVEMALE, M. y SAUGUES, R. (1991) Mise en évidence et évaluation de

- la quantité de lait de vache dans le fromages de brevis par isoelectroenfocalisation des lactoserum: application au cas de fromages très protéolysés: fromages type Roquefort. *Lait* **71**, 501-510.
- RITTENBURG, J. H. (1990) Fundamentals of Immunoassay. En *Development and Application of Immunoassays for Food Analysis*. J. H. Rittenburg (ed.), Elsevier Applied Science, Londres-Nueva York. pp: 29-57.
- RITTENBURG, J. H. y GROTHAUS, G. D. (1992) Immunoassays: Formats and Applications. En *Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay Systems*. M. R. A. Morgan, C. J. Smith y P. A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres-Nueva York. pp: 3-9.
- ROBINSON, R. K. (1995) En *A Colour Guide to Cheese and Fermented Milks*. M. Caric, R. I. Farrow, P. F. Fox y F. V. Kosokowski (eds.), Chapman & Hall, Londres.
- RODRIGUEZ, F. y JUAREZ, M. (1995) Técnicas analíticas para garantizar la calidad de los productos lácteos. *Rev. Esp. Lechería* **64**, 31-39.
- RODRIGUEZ, E., MARTIN, R., GARCIA, T., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1990) Detection of cow's milk in ewe's milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Dairy Res.* **57**, 197-205.
- RODRIGUEZ, E., MARTIN, R., GARCIA, T., AZCONA, J. I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1991) Indirect ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.* **26**, 457-465.
- RODRIGUEZ, E. (1992) Detección por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), utilizando anticuerpos policlonales frente a las caseínas, de las leches de vaca, cabra y oveja en mezclas lácteas frescas y en quesos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- RODRIGUEZ, E., MARTIN, R., GARCIA, T., GONZALEZ, I., MORALES, P., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1993) Detection of cow's milk in ewe's milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Sci. Food Agric.* **61**, 175-180.
- RODRIGUEZ, E., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., GONZALEZ, I., SANZ,

- B. y HERNANDEZ, P. E. (1994) Sandwich ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. *Food Agric. Immunol.* **6**, 105-111.
- ROLLAND, M. P., BITRI, L. y BESANÇON, P. (1993) Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α_{S1} -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.* **60**, 413-420.
- ROLLAND, M. P., BITRI, L. y BESANÇON, P. (1995) Monospecificity of the antibodies to bovine α_{S1} -casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.* **62**, 83-88.
- ROOD, J. y THOMAS, P. (1980) Principles involved in manipulating the yields and concentrations of the constituents of milk. *FIL (éd), Bruselas, Doc.* **125**, 66-72.
- ROSE, D., DAVIES, D. T. y YAGUCHI, M. (1969) Quantitative determination of the major components of casein mixture by column chromatography on DEAE cellulose. *J. Dairy Sci.* **52**, 8-11.
- ROSEN, J. M. (1987) Milk protein gene structure and expression. En *The Mammary Gland*. M. C. Neville y C. W. Daniel (ed.), Plenum Publishing Corporation, Nueva York. pp. 301-322.
- RUIZ MARTINEZ, E. y SANTILLANA LOPEZ, I. (1986) Determinación de mezclas de leche de vaca, cabra y oveja por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. *Alimentaria* **171**, 55-64.
- SALTER, D. N., FORD, J. E., SCOTT, K. J. y ANDREWS, P. (1972) Isolation of the folate-binding protein cows' milk by the use of affinity chromatography. *FEBS Lett.* **20**, 302-306.
- SAMARAJEWA, U., WEI, C. I., HUANG, T. S. y MARSHALL, M. R. (1991) Application of immunoassay in the food industry. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 403-434.
- SAUER, VON S., DIETRICH R., SCHNEIDER, E. y TERPLAND, G. (1991) Development of an immunoassay to detect cow's milk in ewe's and goat's milk. *Archiv. Lebensmittelhyg.* **42**, 133-160.

- SCHMIDT, D. G. (1982) Association of casein and casein micelles structure. En *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. I. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, Nueva York.
- SCHÖNHERR, O. T. y HOUWINK, E. H. (1984) Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies. *Antonie Von Leeuwenhoek* **50**, 597-623.
- SHINODA, I., FUSHIMI, A., KATO, H., OKAI, H. y FUKUI, S. (1985) Bitter taste of synthetic C-terminal tetradecapeptide of bovine β -casein, H-Pro¹⁹⁶-Val-Leu- Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val²⁰⁹-OH, and its related peptides. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2587-2594.
- SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, B. L. y COOMANS, D. (1977) Application of linear discriminant analysis to differentiation of pure milk from different species and mixtures. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 1382-1385.
- SNOEREN, T. H., VAN DER SPECK, C. A. y PAYENS, T. A. J. (1977) Preparation of κ -casein and minor α_s -casein by electrostatic affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* **490**, 255-259.
- ST-MARTIN, M. y PAQUIN, P. (1990) Ion-exchange fast protein liquid chromatography optimization of the purification of caseins using a not-denaturing detergent. *J Dairy Res.* **57**, 63-68.
- SWAISGOOD, H. E. y BRUNNER, J. R. (1962) Characterization of kappa-casein obtained by fractionation with trichloroacetic acid in a concentrated urea solution. *J. Dairy Sci.* **45**, 1-11.
- SWAISGOOD, H. E. (ed.) (1975) *Methods of Gel Electrophoresis of Milk Proteins*. American Dairy Science Association, Champaign, III.
- SWAISGOOD, H. E. (1982) Chemistry of milk protein. En *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. I. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, Londres. pp: 1-59.
- SWAISGOOD, H. E. y CATIGNANI, G. L. (1987) Use of immobilized proteinases and peptidases to study structural changes in proteins. *Methods Enzymol.* **135**, 596-620.

- SWAISGOOD, H. E. (1992) Chemistry of caseins. En *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. I. P. F. Fox (ed.), Elsevier Science Publishers, Essex. pp: 63-110.
- SWAISGOOD, H. E. (1993) Review and update of casein chemistry. *J. Dairy Sci.* **76**, 3056-3061.
- SYVÄOJA, E. L. (1992) Quantitative determination of the main casein components and purification of α_{s2} - and κ -casein from bovine milk. *Milchwiss.* **47**, 563-566.
- TAMIME, A. Y., DALGLEISH, D. G. y BANKS, W. (1991) En Introduction. En *Feta and Related cheeses*. R. K. Robinson y A. Y. Tamime (eds.), Ellis Herwood, London. pp: 1-9.
- TARRASUK, N. P., YAGUCHI, M. y CALLIS, J. B. (1965) Effect of temperature on the composition of casein fractions eluted from DEAE-cellulose column. *J. Dairy Sci.* **48**, 606-609.
- THOMPSON, M. P., KIDDY, C. A., PEPPER, L. y ZITTLE, C. A. (1962) Variations in the α_{s1} -casein fraction of individual cow's milk. *Nature* **195**, 1001-1002.
- THOMPSON, M. P. y KIDDY, C. A. (1964) Genetic polymorphism in casein cow's milk III. Isolation and properties of α_{s1} -casein A, B, and C. *J. Dairy Sci.* **47**, 626-632.
- THOMPSON, M. P. (1966) DEAE-cellulose-urea chromatography of casein in presence of 2-mercaptoethanol. *J. Dairy Sci.* **49**, 792-795.
- THOMPSON, M. P. (1970) Phenotyping milk proteins: A review. *J. Dairy Sci.* **53**, 1341-1348.
- THOMPSON, M. P. (1971) α_s - and β -Caseins. En *Milk Proteins*, Vol. II. H. A. McKenzie (ed.) Academic Press, Nueva York. pp:117-132.
- THREADGILL, D. W. y WOMACK, J. E. (1990) Genomic analysis of the major bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6935-6942.
- TOWBIN, H. J., STAHELIN, T. y GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some

- applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- TRIEU-CUOT, P., ARCHIERI-HAZE, M. J. y GRIPON, J. C. (1982a) Effect of aspartyl proteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on caseins. *J. Dairy Res.* **49**, 487-500.
- TRIEU-CUOT, P., ARCHIERI-HAZE, M. J. y GRIPON, J. C. (1982b) Comparative study of the action of metalloproteinases from *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on α_{s1} and β -caseins. *Lait* **62**, 234-241.
- TRIEU-CUOT, P. y GRIPON, J. C. (1982) A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.* **49**, 501- 510.
- TRIPATHI, K. K. y GEHRKE, C. W. (1969) Chromatography and characterization of gamma-casein. *J. Chromatogr.* **43**, 322-321.
- TRIPATHI, K. K. y GEHRKE, C. W. (1970) Chemical and chromatographic isolation of kappa-casein. *J. Chromatogr.* **46**, 280-285.
- TYSSEN, P. (1985) Enzymes used in activity amplification assays. En *Practise and Theory of Enzyme Immunoassays*. R. H. Burdon y P. H. Van Knippenberg (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres. pp: 174-204.
- VAN WEEMUN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **15**, 232-236.
- VILLOTE, J. L., SOULIER, S., MERCIER, J. C., GAYE, P., HUE-DELAHAIE , D., y FURET, J. P. (1987) Complete nucleotide sequence of bovine α -lactalbumin gene. Comparison with its rat counterpart. *Biochim.* **69**, 609-620.
- VISSER, F. M. W. y DE GROOT-MOSTERT, A. E. A. (1977) Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Neth. Milk Dairy J.* **31**, 247-264.
- VISSER, S. (1981) Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. *Neth. Milk*

Dairy J. **35**, 65-88.

VISSER, S., SLANGEN, K. J. y ROLLEMA, H. S. (1986) High-performance liquid chromatography of bovine caseins with the application of various stationary phases. *Milchwiss.* **41**, 559-562.

VOGLINO, G. F. (1972) A new β -casein variant in Piedmont cattle. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* **3**, 61-62.

VOLLER, A., BIDWELL, D. y BARTLETT, A. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay. En *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. N. R. Rose, H. Friedman y J. L. Fahey (eds.), American Society for Microbiology, Washington D. C. pp: 99-109.

VREEMAN, H., BOTH, P., BRINKHUIS, J. A. y VAN DER SPEK, C. (1977) Purification and some physicochemical properties of bovine kappa-casein. *Biochem. Biophys. Acta* **491**, 93-103.

VREEMAN, H. J., VISSER, S., SLANGEN, C. J., y VAN RIEL, J. A. M. (1988) Characterization of bovine κ -casein fraction and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high performance gel-permeation chromatography. *Biochem. J.* **240**, 87-97.

WAKE, R. G. y BALDWIN, R. L. (1961) Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochem. Biophys. Acta* **47**, 225-239.

WALSTRA, P. y JENNESS, R. (1987) *Química y Física Lactológica*. Acribia (ed.), Zaragoza.

WAUGH, D. F., LUDWIG, M. L., GILLESPIE, J. M., MELTON, B., FOLEY, M. y KLEINER, E. S. (1962) The α_s -caseins of bovine milk. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4929-4938.

WEI, T. M. y WHITNEY, R. McL. (1985) Batch fractionation of bovine caseins with diethylaminoethyl cellulose. *J. Dairy Sci.* **68**, 1630-1636.

WILCHECK, H., y BAYER, E. A. (1988) The avidin-biotin complex in bioanalytical

- applications. *Anal. Biochem*, **171**, 1-32.
- WHITNEY, R. McL., BRUNNER, J. R., EBNER, K. E., FARRELL, H. M., Jr., JOSEPHSON, R. V., MORR, C. V. y SWAISGOOD, H. E. (1976) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fourth revision. *J. Dairy Sci.* **59**, 785-815.
- WHITNEY, R. McL. (1988) Proteins of milk. En *Fundamentals of Dairy Chemistry*. N. P. Wong (ed.), Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York. pp: 81-169.
- YAGUCHI, M. y ROSE, D. (1971) Chromatographic separation of milk proteins: A review. *J. Dairy Sci.* **54**, 1725-1743.
- YALLOW, R. S. y BERSON, S. A. (1959) Assay of plasma insulin in human subjects of immunological methods. *Nature* **184**, 1648-1649.
- YOSHIKAWA, M., TANI, F., YOSHIMURA, T. y CHIBA, H. (1986) Opioid peptides from milk proteins. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2419-2426.
- ZITTLE, C. A. y CUSTER, J. H. (1963) Purification and some of the properties of α_s -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.* **46**, 1183-1188.